

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
an der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. G. Röhrborn)

Die synergistische Wirkung von Coffein und Benzo(a)pyren
am Knochenmark des Chinesischen Hamsters

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin.

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sylvia Tasche

1978

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
an der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. G. Röhrborn)

Die synergistische Wirkung von Coffein und Benzo(a)pyren am Knochenmark des Chinesischen Hamsters



D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin.

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sylvia Tasche

1 9 7 8



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez.: Prof. Dr. Reinauer

Referent
gez.: Prof. Dr. Röhrborn
Korreferent
gez.: Prof. Dr. Ohnesorge

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung und Problemstellung	1
B. Literaturübersicht	4
I. Die mutagene Wirkung von Benzo(a)-pyren	4
II. Die mutagene Wirkung von Coffein	5
III. Die synergistische Wirkung von Coffein	8
IV. Der Zellzyklus	14
V. Mutationen	20
C. Material und Methode	30
I. Material	
1. Chemische Struktur und Pharmakologie von Coffein	30
2. Chemische Struktur und Pharmakologie von Benzo(a)pyren	39
II. Methode	42
1. Versuch	47
2. Präparation	51
3. Färbung	54
D. Ergebnisse	57
I. Kontrolle	57
II. Coffein	58
III. Benzo(a)pyren	58

IV.	Coffein und Benzo(a)pyren	59
V.	Einfluß der Dosis auf die Mutagenität von Benzo(a)pyren	59
VI.	Einfluß des Suspensionsmittels auf die Mutagenität von Benzo(a)pyren	64
E.	Diskussion	69
F.	Zusammenfassung	90
G.	Literaturverzeichnis	91

A. Einleitung und Problemstellung

Es ist allgemein bekannt, daß die zu den Genußmitteln gerechneten Getränke Kaffee, Cola und Tee in mehr oder weniger hohen Konzentrationen Coffein enthalten. In hohen Dosen aufgenommen gehört Coffein zu den stärksten Giften, in kleinen Mengen gegeben hat es jedoch physiologische Effekte, eine Erkenntnis, die zur Verwendung von Coffein in Dosen zwischen 100 mg und 300 mg in Pharmaka führte. Als Beispiele seien hier die Anwendung in der Migränetherapie genannt, in der Coffein zur Kontraktion der Hirngefäße führt, die Verwendung bei Angina pectoris zur Dilatation der Koronargefäße, am Herzen zur Steigerung der positiv inotropen Wirkung und an der Niere als schwaches Diuretikum. In antineuralgischen Mischpräparaten wird der Stoff als belebende Komponente verwandt.

Die zweite Substanz, das Benzo(a)pyren, wurde zunächst durch den Nachweis in der Luft (besonders im Ruß), im Wasser, im Teer, Tabakrauch und Röstprodukten wie geräuchertem Fisch und Fleisch (GORELOVA und DIKUN, 1958) zu den künstlichen, zivilisationsbedingten Noxen gerechnet. Doch dann kam 1956 von KNORR der Hinweis, daß auch in Naturprodukten wie Erdöl und Kohle Benzpyren zu finden sei, ebenso wie im Boden, in Pflanzen und Mikroorganismen (BINET und MALLEY, 1963; BORNEFF, 1964; BLUMER, 1961;

MALLET und HEROS, 1960 und 1962; GRÄF, 1965), und das somit das natürliche Vorkommen dieser Substanzen grundsätzlich mit zu diskutieren sei.

Die vom Menschen im Verlauf eines Jahres aufgenommene Menge Benzpyren entfällt ungefähr zu gleichen Teilen auf die mit Nahrungsmitteln, Trinkwasser und Zigaretten zugeführte Dosis und die aus der Luft eingeatmeten Konzentrationen. In der Luft befinden sich durch Autoabgase und Industrieemission in Düsseldorf in den Wintermonaten immerhin 255 μg Benzpyren pro Gramm Staub, im Sommer sinkt der Gehalt auf ein Zehntel.

Legt man diese Zahlen zu Grunde, so ergibt sich für die Lungenaufnahme eine Menge zwischen 170 μg und 850 μg Benzpyren pro Jahr. Im gleichen Rahmen - ungefähr 300 μg pro Jahr - liegt der Wert für die Zufuhr von Benzpyren mit Nahrungsmitteln.

Nahrungsmittel	Verzehr pro Kopf und Jahr in kg	Benzpyren-Konzentration in μg je kg Frischgewicht	Zufuhr an Benzpyren pro Jahr in μg
Brot	131	0,35	45,5
Kartoffeln	110	0,04	4,4
Gemüse (Blätter)	140	1,25	175,0
Gemüse (Wurzel)	35	0,08	2,8
Trinkwasser	1000	0,002	2,0
insgesamt:			229,7

Die Gesamtmenge erhöht sich noch um das Benzpyren in geräuchertem Fleisch und Fisch sowie in Pflanzenfetten und -ölen auf etwa 300 μg .

Abb.1: Benzpyrengesamt in Nahrungsmitteln (nach BORNEFF, 1974)

Aufgrund der Ubiquität beider Substanzen in der Umgebung des Menschen, ihrer hohen Konzentration und im Falle des Benzpyren aufgrund der Unvermeidbarkeit des Kontaktes mit dem Stoff, ist es also wichtig, eine mögliche schädigende Wirkung der Substanzen auf das Erbgut des Menschen abzuklären.

Da der Mensch aus bekannten Gründen als Versuchsobjekt entfällt, wurden die Experimente und die zytogenetische Untersuchung am Knochenmark des Chinesischen Hamsters durchgeführt, der wie der Mensch zu den Säugetieren gerechnet wird. Besonderes Anliegen der Arbeit war dabei nicht nur den Grad der mutagenen Wirkung beider Agentien einzeln zu ermitteln, sondern eine mögliche synergistische Wirkung von Coffein, wenn es - wie auch in der Umwelt des Menschen anzutreffen - mit Benzpyren gemeinsam auf einen Organismus einwirkt, zu untersuchen.

Synergistisch bzw. Synergismus soll in diesem Fall als gegenseitige Beeinflussung mehrerer Stoffe im Sinne einer additiven oder potenzierenden, unter Umständen auch neuartigen Wirkung definiert sein, so daß diese Arbeit den Nachweis darüber erbringen soll, ob eine unterschwellig vorhandene Mutagenität sich durch gleichzeitige Cofeingabe manifestiert bzw. ob eine vorhandene chromosomenschädigende Wirkung von Benzpyren durch die simultane Applikation von Coffein noch verstärkt werden kann.

B. Literaturübersicht

I. Die mutagene Wirkung von Benzo(a)pyren

Nachdem schon 1937 die Forschungen HIEGERS nach der krebsauslösenden Substanz im Steinkohleteer zur Isolierung von Benzpyren geführt hatten, konnte drei Jahre später im Rahmen einer Untersuchung über mutationsauslösende Chemikalien durch MOTTRAM der Nachweis der mutagenen Wirkung auch für Benzpyren erbracht werden (BAUER, 1949). Das für Paramecium erstellte Resultat konnte 1975 durch Arbeiten von McCANN, der im Salmonella/Mikrosomen Test 300 Substanzen auf ihre chromosomenschädigende Wirkung hin untersuchte, auch für Salmonellen gültig bewiesen werden.

Hatten diese beiden Arbeiten den Nachweis für Ciliaten und Bakterien erbracht, so untersuchten 1976 BASLER und RÖHRBORN die mutagene Wirkung von Benzpyren erstmals am lebenden Säuger. Ausgehend von BAUERs Krebstheorie (BAUER, 1949), der zu Folge der erste Schritt der Umwandlung einer normalen Zelle in eine Krebszelle auf einer Mutation beruhe, experimentierten sie mit dem bekanntermaßen kanzerogenen Stoff (BRYAN und SHIMKIN, 1943; THORNTON und ADAMS, 1944; BLACKLOCK, 1957; SHUBIK et al., 1960; SHUBIK, 1961; HERROLD und DUNHAM, 1962; TOTH und SHUBIK, 1967) an Metaphase II Oocyten

von NMRI Mäusen und am Knochenmark des Chinesischen Hamsters. Für beide Testsysteme konnte eine mutagene Wirkung nachgewiesen werden.

II. Die mutagene Wirkung von Coffein

Nachdem schon 1820 der Chemiker F.F. RUNGE bei der Analyse der in der Kaffeebohne enthaltenen Stoffe das Alkaloid Coffein entdeckt hatte, und MEDICUS 1875 die Erstellung der Strukturformel gelungen war, ermittelten 1948 DEMEREC et al. sowie FRIES und KIHLMAN unabhängig voneinander bei der Untersuchung mutagener Substanzen an Bakterien und Pilzen, daß auch Coffein zu den chromosomenschädigenden Stoffen gerechnet werden muß: "In studying the ability of various chemicals to induce mutations we found a very striking effect of the two purine compounds caffeine and theophylline which seems to be of interest from several points of view" (FRIES und KIHLMAN, 1948).

Diese Ergebnisse konnten in den folgenden Jahren durch DEMEREC et al. (1950/51) bei Versuchen mit *E. coli*, sowie durch GEZELIUS (1952), NOVICK (1955) und GREER (1968) bestätigt werden.

Gleichzeitig mit den genannten Arbeiten liefen Versuche, in denen festgestellt werden sollte, ob der mutagene Effekt von Coffein spezifisch für Bakterien und Pilze

war oder ob sich das Ergebnis übertragen ließ: getestet wurden niedrigere Pflanzen (FRIES, 1950; ZETTERBERG, 1959) und höhere Pflanzen (KIHLMAN und LEVAN, 1949; KIHLMAN, 1952). Bei beiden Gruppen ließ sich die an Bakterien und Pilzen gesehene Wirkung ebenfalls beobachten.

Anders bei *Drosophila melanogaster*: hier wurde zum ersten Mal neben mehreren positiven Ergebnissen (ANDREW, 1959; MITTLER, MITTLER und OWENS, 1967; OSTERTAG und HAAKE, 1966; OSTERTAG und FROMME, 1967) von YANDERS und SEATON 1962 eine negative Beobachtung gemacht. Anknüpfend an die von ANDREW 1959 durchgeführten Experimente mit *Drosophila melanogaster* versuchte im gleichen Jahr YANDERS (YANDERS, 1959, nicht veröffentlicht) die Ergebnisse zu bestätigen. Er benutzte jedoch einen anderen Stamm der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Die von ANDREW am Canton-S Stamm gefundenen Ergebnisse - er konnte eine Steigerung der Rate geschlechtsgebundener rezessiver, letaler Mutationen an in Coffein haltigem Medium aufgezogenen Larven und an mit Coffein behandelten ausgewachsenen Tieren nachweisen - konnten jedoch durch YANDERS Arbeit nicht wiederholt werden. YANDERS hatte zwar die gleiche von ANDREW verwandte Dosis genommen, jedoch einen anderen, den Oregon - R Stamm gewählt. Ließ sich die am einen jedoch nicht am anderen Stamm gefundene Wirkung eventuell mit einer stammgebun-

denen Spezifität des Coffein Effektes erklären?

Um diese Frage zu klären, griff YANDERS drei Jahre später zusammen mit SEATON (YANDERS und SEATON, 1962) die o.g. Ergebnisse noch einmal auf und versuchte mit dieser Arbeit ANDREWS Resultate zu reproduzieren. Sie verwandten den gleichen von ANDREW getesteten Stamm (Canton - S) und zusätzlich noch einen zweiten (Oregon - R), um eine Stammbezogenheit der mutagenen Wirkung zu untersuchen: Coffein in gleicher Konzentration wie von ANDREW und YANDERS selbst schon 1959 angewandt wirkte nicht mutagen. Es fand sich lediglich eine Wachstumsverzögerung der Larven in Coffein haltigem Medium.

Noch im gleichen Jahr wurde diese neue These durch eine Arbeit von LYON et al. (1962), durchgeführt an Mäusen, gestützt und auch in der darauffolgenden Zeit (ADLER, 1966; ADLER und RÖHRBORN, 1969; RÖHRBORN, 1972) gelang es nicht, zu einem positiven Resultat bei Mäusen zu gelangen: Es gibt keine Anzeichen für eine sicher mutagene Wirkung von Coffein bei höheren Organismen und Säugern.

Gleichzeitig mit den ersten in vivo Versuchen an Mäusen begannen die Untersuchungen an Menschen. Da der Mensch als lebendes Versuchsobjekt ausscheidet, gibt es hier nur Ergebnisse von Experimenten mit Zellkulturen

menschlicher HeLa - Zellen (OSTERTAG, DUISBERG und STÜRMANN, 1965), Leukozyten (OSTERTAG, 1966; OSTERTAG und GREIFF, 1967) und Lymphozyten (WEINSTEIN, MAUER und SOLOMON, 1972; WEINSTEIN, MAUER, KATZ und KAZMER, 1973; WEINSTEIN et al., 1975). Jede der genannten Arbeiten führte zu einem positiven, die mutagene Wirkung von Coffein auf Zellkulturen bestätigenden Resultat; ein Befund, der jedoch nicht ohne weiteres in dieser Form auf den Menschen übertragen werden kann, da der Mensch mit seinem Organ - und Enzymsystem, exogenen Einflüssen ausgesetzt, unter Umständen ganz anders auf Noxen reagiert, so daß ein am Tier oder in der Kultur beobachteter positiver Effekt negativ werden kann und umgekehrt.

III. Die synergistische Wirkung von Coffein

Neben diesen teilweise widersprüchlichen Ergebnissen der o.g. Experimente mit Coffein allein, begann WITKIN 1958 das Zusammenwirken der Substanz mit anderen Agentien zu testen.

Sie untersuchte das Zusammenwirken von UV - Strahlen und Coffein bei Bakterien und stellte fest, daß Coffein in an sich nicht toxischen oder mutagenen Konzentrationen nach Bestrahlung mit UV - Licht den letalen und mutagenen Effekt der Strahlen auf Bakterien verstärkt.

Nachfolgende Arbeiten von LIEB (1961), SHANKEL (1962), METZGER (1964), HARM (1966/67) und CLARKE (1967) bestätigten die gefundenen Ergebnisse, brachten aber außer möglichen Hypothesen keine Fortschritte in der Klärung zugrunde liegender Mechanismen.

1969 erschien dann eine weitere Arbeit von WITKIN, die sie zusammen mit FARQUHARSON durchführte, in der getestet wurde, ob sich die bisherigen Ergebnisse für die Kombination von Coffein und UV - Licht, die immer nur an Bakterien mit funktionstüchtigem Repairsystem durchgeführt worden waren, auch auf Bakterien ohne ausreichendes Repairsystem übertragen ließen. Das Resultat war negativ: Es trat keine Wirkung bei repair negativen Zellen auf. Daraus schloß man, daß die Steigerung der Mutationsrate durch Coffein auf einem den Repairmechanismus hemmenden Effekt beruhe.

Es folgten Versuche von BENDIGKEIT und HANAWALT 1968 sowie von WITTE und BÖHME 1972, die aber keine wesentlichen neuen Erkenntnisse brachten.

1967 schon hatte RAUTH versucht, das oben beschriebene Ergebnis an Zellkulturen von Säugern (L - Zellen der Maus) zu reproduzieren. Der Versuch gelang und konnte Jahre später von ROMMELAERE und ERRERA (1972) als auch

von TROSKO und CHU (1971) an Hamsterzellen bestätigt werden. Sie hatten jedoch - wie die o.g. Autoren auch - immer nur den Synergismus von Coffein und UV - Licht getestet.

1970 gingen RAUTH et al. und ein Jahr später auch HARTLEY - ASP und KIHLMAN (1971) dann dazu über, das Zusammenwirken von Coffein auch mit anderen Agentien zu testen. Sie untersuchten aus der Gruppe der Zyto- statika das Mitomycin C an Zellkulturen von Hamstern und Mäusen und auch sie konnten das für UV - Strahlen und Coffein an Pro - und Eukaryonten gefundene Ergebnis bestätigen.

1971 erschien dann die erste Arbeit über eine mögliche synergistische Wirkung zwischen alkylierenden Substan- zen und Coffein von WALKER und REID, 1973 gefolgt von Versuchen von ROBERTS und WARD, sowie von ROBERT und STURROCK. Der synergistische Effekt ließ sich auch für alkylierende Substanzen nachweisen, doch alle bisherigen Arbeiten hatten ausschließlich über Experimente mit Zellkulturen berichtet.

Nach ersten Versuchen mit Coffein und alkylierenden Stoffen am lebenden Säuger, 1975 durchgeführt von FREI und VENITT an weiblichen Mäusen, stellte sich 1976 für

RÖHRBORN und BUCKEL ebenfalls die Frage der Übertragbarkeit der bis dahin erzielten Resultate auf lebende Tiere, speziell Säuger, die dann Hinweise auf menschliche Reaktionen geben könnten.

Sie griffen auf Ergebnisse von WALKER und REID aus dem Jahre 1971 zurück, denen zufolge alkylierende Substanzen und Coffein einen synergistischen Effekt an L - Zellen ausüben. Von diesem sicher positiven Befund mit alkylierenden Agentien ausgehend, wählten sie für ihre Experimente einen anderen - jedoch auch dieser schon getesteten Gruppe zugehörigen - Stoff, Cyclophosphamid, ein in der Tumorthherapie häufig verwandtes Chemotherapeutikum und experimentierten mit ihm am Chinesischen Hamster. Sie untersuchten für verschiedene Coffeindosen, 200 mg/kg und 35 mg/kg, die potenzierende Wirkung auf die ermittelte Mutationsrate der Chromosomen und stellten fest, indem sie auch das Zeitintervall bis zur Präparation variierten, daß nur die höhere Dosis Coffein die mutagene Aktivität von Cyclophosphamid potenziert. Dieser Effekt ist sechs Stunden nach Applikation mehr als doppelt so hoch verglichen mit den Zahlen nach 24-stündigem Intervall zwischen letzter Gabe und Präparation.

Faßt man diese Ergebnisse der genannten Arbeiten bezüglich der mutagenen und der synergistischen Wirkung von Coffein zusammen, so läßt sich sagen: Coffein wirkt sicher mutagen bei Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Kulturen menschlicher Zellen. Widersprüchlich sind die Resultate für *Drosophila melanogaster*; negativ für Säuger.

Ein synergistischer Effekt von Coffein im Sinne von verstärken einer schon vorhandenen Schädigung ließ sich in der Kombination mit UV - Licht, Mitomycin C oder alkylierenden Substanzen bei Bakterien mit funktionstüchtigem Repairsystem, Zellkulturen von Säugern und bei lebenden Säugetieren beobachten.

Wie verhält sich nun Coffein beim lebenden Säuger bezüglich seiner synergistischen Wirkung, kombiniert man es mit Benzpyren?

DONOVAN und DiPAOLO waren 1974 die ersten, die ein Kanzerogen im Zusammenhang mit der Frage nach einem Synergismus von Coffein testeten. Neben Benzpyren wurden in dieser Arbeit an Zellkulturen des Syrischen Hamsters noch N - acetoxy - 2 - fluorenyl acetamid (AcAAF) und N - methyl - N - nitro - N - nitrosoguanidin (MNNG), zwei andere Kanzerogene, untersucht. DONOVAN und DiPAOLO richteten ihre Aufmerksamkeit besonders auf die

Frage, ob es Unterschiede in den Reaktionen der Zellen geben würde, wenn Coffein in verschiedenen Intervallen nach der Benzpyrenapplikation verabreicht wurde.

Es fanden sich tatsächlich erhebliche Differenzen in der Antwort der Zellen auf den zeitlich verschieden gesetzten Reiz. Sie trat aber nur dann ein, wenn zuerst das Karzinogen und dann Coffein gegeben wurde; wurde die Reihenfolge umgekehrt, so traten nur noch die durch die Kanzerogene allein verursachten Veränderungen auf, Coffein hatte keinen zusätzlich verstärkenden Einfluß.

Diese Arbeit soll nun das von DONOVAN und DiPAOLO anschnittene Thema - möglicher Synergismus im Sinne der eingangs genannten Definition zwischen Coffein und Benzpyren - weiterführen und zwar in der Form, daß am lebenden Tier und nicht mehr mit Zellkulturen Versuche durchgeführt werden.

Bevor ich jedoch mit dem Kapitel "Material und Methode" beginne, möchte ich noch kurz den von der Zelle durchlaufenen Zyklus mit den für Schadwirkungen sensiblen Phasen beschreiben, auf den für die Chromosomenanalyse wichtigen Zyklusabschnitt hinweisen und - daran anschließend - die daraus resultierenden Mutationen besprechen.

IV. Zellzyklus

Eine wachsende Zelle durchläuft bis zur Teilung in zwei identische Tochterzellen eine Aufeinanderfolge von physiologisch unterschiedlichen, nicht umkehrbaren Phasen (BUSELMAIER, 1974). Dieser als Intermitosezyklus bezeichnete Vorgang wird unterteilt in die G_1 -, S - und G_2 - Phase.

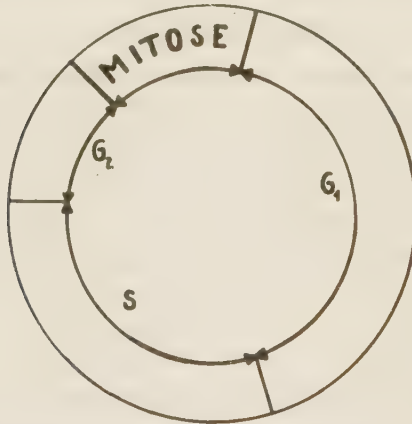


Abb.2: Intermitosezyklus (nach BUSELMAIER, 1974)

Die G_1 - Phase ist die Wachstumsphase. In ihr findet die Bildung der für den weiteren Zyklus wichtigen Proteine und Enzyme statt, ebenso die RNA - Synthese.

Die S - Phase, sie umfaßt 7 - 8 Stunden beim Säuger (BU-

SELMAIER, 1974), ist die Phase der DNA - Replikation. Hier können all die Noxen ansetzen, die durch eine Störung der DNA - Replikation Mutationen erzeugen.

Den Abschluß der S - Phase bildet die Aktivierung von Enzymen, die fähig sind, über einen speziellen Reparaturmechanismus bei der Replikation entstandene "Fehler" zu korrigieren. Dies soll der - laut Theorie verschiedener Autoren - für die mutagene und synergistische Wirkung von Coffein wichtige Angriffspunkt im Zellzyklus sein, eine Annahme, die noch in späteren Kapiteln zu diskutieren sein wird.

Die abschließende G_2 - Phase ist eine kurze Zwischenphase, bevor die Zelle in die Mitose übergeht.

Die Mitose, in der das in der Intermitose identisch replizierte DNA - Material auf die beiden Tochterzellen verteilt wird, ist weiter unterteilbar in die

- Prophase
- Metaphase
- Anaphase und
- Telophase.



Zelle vor der Teilung



Herausbildung der Chromosomen



Verschwinden der Kernmembran,
Ausbildung der Kernteilungsspindel



Einrücken der Chromosomen in den
Äquator der Kernspindel



Ansetzen der Zugfasern an den
Tochterchromosomen



Trennung der Tochterchromosomen



Wanderung der Chromosomen zu den
Polen der Kernspindel, beginnende
Einschnürung des Zellkörpers



Knäuelung der Chromosomen,
Neubildung einer Kernmembran

Bildung der Tochterkerne,
Durchschnürung des Zellkörpers

Abb. 3: Schema der Kern - und Zellteilung (nach LIN-
DER, 1967)

In der Prophase - Dauer zwischen 0,5 und 4,5 Stunden (BUSELMAIER, 1974) - werden die Chromosomen, bestehend aus den beiden Tochterchromatiden, durch starke Spiralisierung in die für die spätere Teilung in die beiden Tochterzellen nötige Form gebracht.

Die folgende Metaphase umfaßt die Auflösung der Kernmembran und die Ausbildung des Spindelapparates. Dieser setzt sich aus zahlreichen Mikrotubuli zusammen, die aus in der vorhergehenden G_1 - Phase gebildeten und dann polymerisierten subunits bestehen. Die Mikrotubuli greifen an den nur noch durch die Zentromere zusammengehaltenen Chromatiden der Chromosomen an und ordnen diese in der Äquatorialebene an.

Diese zweite Phase der Mitose ist der für die Chromosomenanalyse wichtige Moment. Durch Zugabe von Colchicin, das sich - einer Hypothese zufolge - mit den subunits verbindet und somit die Ausbildung des funktionsfähigen Spindelapparates verhindert, läßt sich die in den Zellen angelaufene Metaphase stoppen und die Umwandlung in die Anaphase verhindern. Die Chromosomen liegen in der zur Analyse notwendigen spiralisierten Form vor und können auf Veränderungen hin untersucht werden.

Setzt man den Zellen kein Colchicin zu, so folgt der Metaphase die Anaphase.

In dieser Phase, mit einer Dauer von 2 bis 20 Minuten (BUSELMAIER, 1974), verläuft die Trennung des Zentromers, so daß die Chromatiden durch Verkürzung der Spindelfasern zu den entgegengesetzten Polen auseinander gezogen werden können.

Die die Mitose abschließende Telophase vollendet die endgültige Teilung der Stammzelle in zwei identische Tochterzellen. Die dicht spiralisierten Chromatiden lockern sich wieder auf, aus Teilen des endoplasmatischen Retikulums bildet sich eine neue Kernmembran, die Neubildung der Nukleolen erfolgt: der Kern liegt wieder in der für die Interphase typischen Arbeitsform vor. In der Äquatorialebene bildet sich die Zellplatte zur

trennenden Zellmembran um und der Zelleib schnürt sich ein.

Wäre nun in dem der Mitose vorangehenden Intermitosezyklus ein Mutationen auslösendes Agens wirksam geworden, so wäre die Änderung in den Chromosomen bzw. im Chromosomensatz in der folgenden Mitose an die Tochterzellen weitergegeben worden.

V. Mutationen

Die Mutationen, seit DE VRIES (1901, 1912, 1916) als "jede plötzlich auftretende, dann aber konstant weiter übertragbare und irreversible Änderung im Erbgut der Organismen" definiert, lassen sich wie folgt einteilen:

I. Gen - oder Punktmutationen,

Veränderungen, die unter Einfluß äußerer Faktoren in der DNA eines Gens auftreten durch Austausch einer Base gegen eine andere, durch einen oder mehrere Wechsel in der Reihenfolge der Basen oder dadurch, daß eine oder mehrere Basen verloren gehen.

Da diese Veränderungen jedoch im molekularen Bereich liegen, konnten sie bei der hier erfolgten lichtmikroskopischen Auswertung nicht berücksichtigt werden.

II. Chromosomenaberrationen,

die als strukturelle und oder numerische Chromosomenaberrationen in Erscheinung treten.

a. Strukturelle Aberrationen betreffen Änderungen in der Architektur der Chromosomen, ohne das dabei der Aufbau der Gene verändert wird. Zu ihnen werden gerechnet:

1. Gaps, lokale Achromasien oder achromatische Läsionen:

alle drei Ausdrücke bezeichnen ein und dasselbe, bis

heute noch nicht abschließend geklärte Phänomen: eine lichtmikroskopisch dem Bruch ähnliche Diskontinuität im Chromosom, die jedoch keine echte zu sein braucht. Elektronenmikroskopisch und auch durch die sog. "milde Präparation" 1971 von BRØGGER durchgeführt, konnten für die optisch leeren Stellen Chromatinfibern nachgewiesen werden, die beide "Bruchenden" verbinden. Es wird noch diskutiert, ob diese Fibern in der nächsten Interphase als Leitschiene für den Repair dienen und damit eine Restitution bewirken, oder ob durch sie noch stärkere Mutationen ausgelöst werden.

Bis zur endgültigen Klärung der Frage werden deshalb in den Statistiken durchgeführter Experimente die Ergebnisse inklusive und exklusive Gaps angegeben.

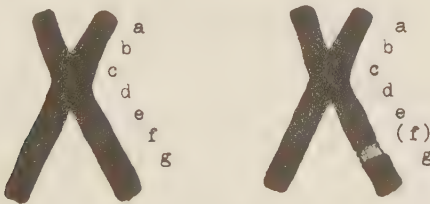


Abb.4: Chromatidengap

2. Brüche,

die das ganze Chromosom oder auch nur ein Chromatid betreffen können. Es handelt sich dabei - diesmal um eine echte - Diskontinuität im Chromosom bzw.

Chromatid.

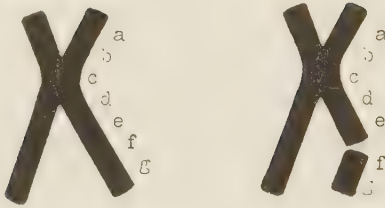


Abb.5: Chromatidenbruch

3. multiple Fragmentation von Chromosomen,

resultieren aus einem oder mehreren Brüchen.

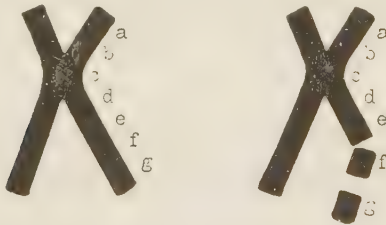


Abb.6: Multiple Chromatidenfragmentation

4. Chromosomenmutationen

Diese lassen sich weiter unterteilen in

- Duplikationen
- Inversionen
- Translokationen und
- Deletionen bzw. Defizienzen.

Bei Deletionen, Defizienzen, Duplikationen und Inver-

sionen handelt es sich um Strukturveränderungen auf das Einzelchromosom beschränkt, während an Translokationen zwei oder mehrere Chromosomen beteiligt sein können.

- Duplikationen beinhalten das zweimalige Auftreten eines Chromosomensegmentes im haploiden Chromosomensatz, ein Umbau, der zur Entstehung neuer Gene beitragen kann und somit eine Rolle in der Evolution spielt.

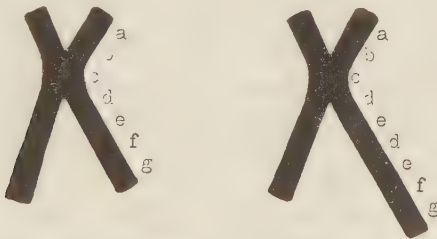


Abb.7: Chromatidenduplikation (Segment d-e)

- Inversionen. Darunter versteht man eine Umkehr der Gensequenz innerhalb eines Chromosomenarmes. Nach zwei Brüchen im Chromosom dreht sich das herausgebrochene Stück um 180° und wird umgekehrt wieder eingebaut. Je nachdem ob es sich um ein oder mehrere Segmente handelt, spricht man von einfachen oder komplexen Inversionen.

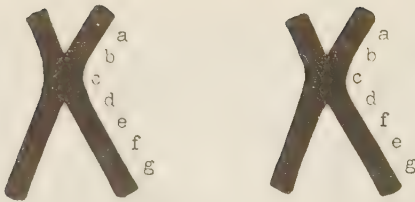


Abb.8: Inversion der Segmente e-f innerhalb einer Chromatide

- Translokationen. Chromosomenveränderungen, bei denen nach zwei Brüchen das entstandene Bruchstück im gleichen oder in einem anderen Chromosom neu eingebaut wird, nennt man eine Translokation. Dieser Begriff bezeichnet aber auch den Austausch zweier Segmente zwischen homologen oder inhomologen Chromosomen. Hierbei setzt man dem Begriff zur Differenzierung jedoch "reziprok" hinzu.



Abb.9: Reziproke Translokation

- Deletionen und Defizienzen, Bezeichnungen, die eigentlich zwei verschiedene Strukturveränderungen im Chromosom beschreiben, werden vielfach synonym verwandt. Obwohl Deletion interkalare Strukturaus-

fälle, Defizienzen jedoch terminale bezeichnen, ist der Effekt mikroskopisch, bei einfacher Färbung der Chromosomen, nicht zu unterscheiden. Der Gebrauch des Ausdrucks Deletion für beide Umbautypen ist deshalb gerechtfertigt.

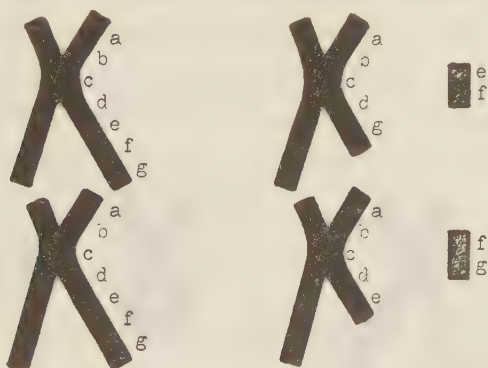


Abb.10: Deletion bzw. Defizienz

Durch die Deletion bzw. Defizienz entstehen in der Zelle Fragmente, die entweder - sofern sie ein Zentromer haben - als zentrische oder - falls dieses fehlt - als azentrische Fragmente bezeichnet werden. Zentrische Fragmente werden vom Spindelapparat zu einem der Spindelpole gezogen und dann in eine Tochterzelle weitergegeben, während azentrische Fragmente meistens verloren gehen. Von der Größe der Stücke und von der Tatsache, ob diese Träger rezessiver oder dominanter Faktoren waren,

hängt das Ausmaß der Auswirkungen ab.

- Ringchromosomen. Die Definition für Ringchromosomen leitet sich direkt aus dem für Deletionen Gesagten ab: sie entstehen in der Folge zweier endständiger Brüche eines Chromosoms, womit aus o.g. Gründen ein Genverlust verbunden ist. Die "offenen" Enden des Bruches schließen sich dann zu einem Ring zusammen, das sog. Ringchromosom und zwei azentrische Fragmente sind entstanden.

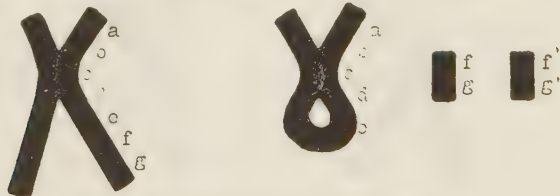


Abb.11: Entstehung eines Ringchromosoms

b. Numerische Chromosomenaberrationen oder Genommutationen betreffen die Chromosomenzahl der Zelle ohne die Struktur der einzelnen Chromosomen oder ihren Gengehalt in Mitleidenschaft zu ziehen.

Sie entstehen durch Fehlleistungen in der Mitose oder Meiose und können entweder in einer Verdoppelung oder Vervielfachung des Chromosomensatzes bestehen - man nennt sie dann Polyploidien - oder in Unregelmäßigkeiten in der Chromosomenzahl. Das bedeutet, daß in einem

sonst normalen diploiden Satz ein Chromosom zum Beispiel nur einmal vorkommt (Monosomie) oder dreimal (Trisomie). Diese Form wird als Aneuploidie bezeichnet.

Abschließend sei die Einteilung der besseren Übersicht und Verständlichkeit halber noch einmal schematisch zusammengefaßt (nach RÖHRBORN, 1970):

1. GEN - oder PUNKTMUTATIONEN

- Basensubstitution
- Deletion einzelner Basen
- Insertion einzelner Basen

2. CHROMOSOMENABERRATIONEN

- strukturelle Chromosomenaberrationen

Gaps

Brüche

Fragmente

Chromosomenmutationen - Duplikationen

Inversionen

Translokationen

Deletionen

Ringchromosomen

- Genommutationen

alle numerischen Veränderungen - Polyploidien

Aneuploidien

- Monosomie

Trisomie

Der allen genannten strukturellen Mutationen gemeinsam

vermutete Mechanismus wurde erstmals vor 45 Jahren in der "Bruch - Reunions Hypothese" dargelegt (STADLER, 1932; SAX, 1940 und 1941; neuere Übersichten u.a. bei CATCHESIDE, 1948; KIHLMAN, 1961; WOLFF, 1961 und 1963; RIEGER und BÖHME, 1962; RIEGER, 1966). Sie besagt, daß alle Änderungen in der Chromosomenstruktur primär auf einem spontanen oder experimentell ausgelösten Bruch beruhen. Für die Mehrzahl der so entstandenen Diskontinuitäten nimmt man eine restitutio ad integrum an, aus der keinerlei sichtbare Veränderungen resultieren. Für die übrigen gibt es zwei hypothetische Wege:

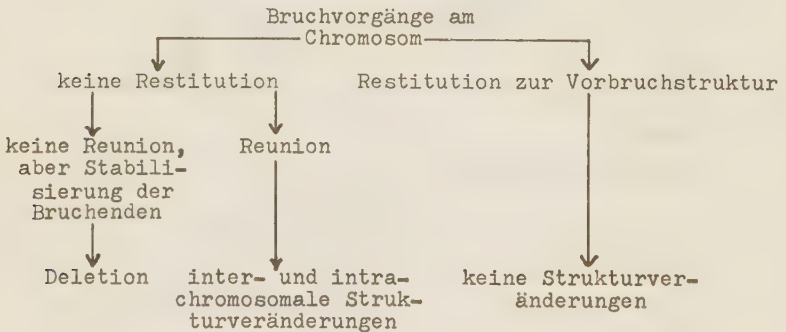


Abb.12: Bruchvorgänge am Chromosom und die Folgen
(nach RIEGER und MICHAELIS, 1967)

1. die Reunion. Die Bruchflächen verwachsen wieder, aber nicht in der vorherigen alten Anordnung. Das Resultat sind die o.g. intra - und interchromosomalen Struktur-

veränderungen.

2. Stabilisierung der Bruchenden. Der Bruch bleibt "offen", es resultieren Deletionen.

Als Antwort auf diese Theorie wurde, 1955 beginnend, 1959, 1963 und 1969 fortsetzend, von REVELL die Austauschhypothese aufgestellt, die als Primärereignis nicht den Bruch sondern intra - und interchromosomale Austauschprozesse postulierte.

Kurz umrissen besagt REVELLs Theorie, daß zur Aberrationsinduktion eine nicht näher definierte "geringfügige" Störung besteht, der die "Austauscheinleitung" folgt, die ebenso wie die geringfügige Störung noch reversibel ist. Sie wird erst nach einiger Zeit vom eigentlichen Austauschprozeß gefolgt.

Beide Theorien befinden sich noch in der Diskussion, so daß die Ungültigkeit der einen Theorie zu Gunsten der anderen bis heute nicht endgültig ausgeschlossen werden konnte.

C. Material und Methode

I. Material

1. Chemische Struktur und Pharmakologie von Coffein

Die zu testende Substanz Coffein ($C_8H_{10}N_4O_2$) mit dem Synonym 1,3,7 - Trimethylxanthin, ist ein weißes, geruchloses, bitter schmeckendes Kristallpulver. Es gehört aufgrund seiner Struktur zu der Gruppe der einfachen heterozyklischen Verbindungen, d.h. es enthält außer C - Atomen auch andere Atome als Ringglieder in seinem Ringsystem.

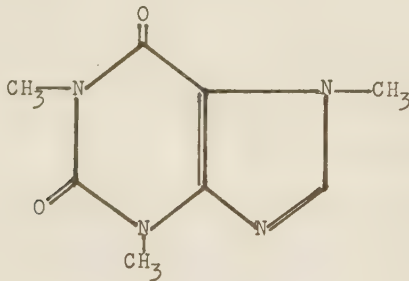


Abb.13: Strukturformel von Coffein
(nach CHRISTEN, 1971)

Das Ringsystem des Coffeins besteht aus einem 5 - Ring und einem 6 - Ring, wobei in jedem zwei C - Atome durch N - Atome substituiert sind. Diese Struktur entspricht dem Puringerüst, weshalb Coffein - wie auch die Basen Adenin und Guanin der Nukleinsäuren - zu den Purinalka-

liden gerechnet wird.

Nach peroraler Aufnahme von Coffein durch den Menschen in Form von Kaffee, Tee oder Cola - wobei eine Tasse Kaffee oder Tee 100 - 150 mg Coffein enthält (RITCHIE, 1970) - erscheint der Stoff schon nach wenigen Minuten unverändert im Plasma und erreicht hier bereits nach einer Stunde seine maximale Konzentration. Da die Resorption nach oraler Aufnahme derart rasch erfolgt, ist der Kurvenverlauf fast gleich mit dem aus der i.v. Resorption resultierenden (AXELROD und REICHENTHAL, 1953). Mit dem Blutstrom erfolgt die Verteilung in die einzelnen Gewebe und da Coffein gut wasserlöslich ist, hängt die Höhe der Einlagerung vom Wassergehalt der einzelnen Gewebetypen ab.

Die Wirkungsweise und die Angriffspunkte von Coffein im menschlichen Körper sind sehr gut erforscht; da sie recht vielfältig sind, sollen im Folgenden nur die wichtigsten genannt werden.

a. Eingriffe in den Stoffwechsel

Coffein greift direkt in den Stoffwechsel des Organismus ein, indem es in der Zelle zum einen die Catecholamin - Freisetzung, die zur Aktivierung der Adenylcyclase und damit zur gesteigerten Bildung von 3',5'-AMP aus ATP notwendig ist, stimuliert und zum anderen den Abbau

- durch Hemmung der Phosphodiesterase - von cyclischem 3', 5'- AMP zu inaktivem 5'- AMP verhindert.

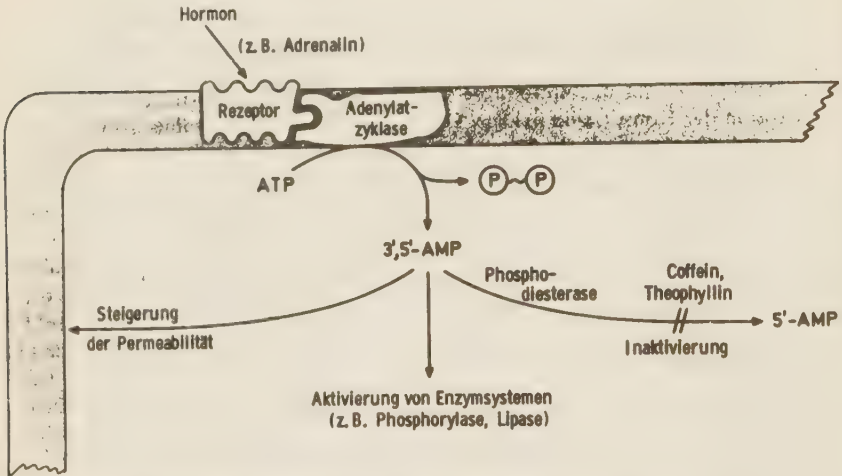


Abb. 14: Wirkung von Coffein im Stoffwechsel (nach KARL-SON, 1972)

Durch diese beiden Wege ergibt sich ein Anstieg von cyclischem 3', 5'- AMP in der Zelle, dem sogenannten "second messenger", der seinen spezifischen Angriffspunkt in den cyclo - AMP empfindlichen Enzymsystemen findet. Zu diesen Systemen gehört die Triglyceridlipase, die die Spaltung von Tri - in Diglyceride, die Mobilisierung der Depotfette und somit den Anstieg der unveresterten, freien Fettsäuren im Blut bewirkt. Diese funktionieren als energetische Reserven, so daß Coffein die frühzeitige

Ermüdung des Organismus bei Belastung verzögern kann.

Den gleichen Effekt findet man im Kohlenhydratstoffwechsel, wo durch den Anstieg des am Abbau gehinderten 3', 5'- AMP die Phosphorylase aktiviert wird. Sie bewirkt eine verstärkte Glykogenolyse mit nachfolgender Blutglucosesteigerung. Diese freie Blutglucose wirkt ebenso wie die FFS als Energielieferant. Im Kohlenhydratstoffwechsel wirkt Coffein somit als Antagonist von Insulin, das im Körper genau in entgegengesetzter Weise wirkt, nämlich in Stimulation der Phosphodiesterase mit resultierender Lipolyse - und Phosphorylasehemmung.

b. Einfluß auf vegetative Funktionen und das ZNS

Durch seine gute Lipoidlöslichkeit permeiert Coffein schnell ins Gehirn und die cerebrospinale Flüssigkeit. Schon nach 15 Minuten beim Kaninchen und nach 30 Minuten beim Hund und Mensch (EICHLER, 1976) nach Injektion ist zwischen Blut und Liquor ein Konzentrationsgleichgewicht erreicht. Die Konzentration fällt dann mit beginnendem Abbau nur langsam ab, so daß erst nach zwei Stunden die ersten metabolischen Produkte nachzuweisen sind.

Mit steigender Dosis wirkt Coffein leistungssteigernd, aber nur bis zu einer bestimmten Konzentration: dann setzt sich trotz steigender Dosen eine leistungslabilisierende Wirkung durch, d.h. trotz weiterhin steigen-

der Arbeitsgeschwindigkeit steigt die Fehlerquote. Auch trifft diese leistungsanregende Wirkung nur für kurzfristige motorische Leistungen zu, bei Dauerleistungen tritt schon nach ungefähr 30 Minuten ein Leistungsabfall in bezug auf Qualität und Ausdauer der erbrachten Arbeit auf.

Dieser nach physiologischen Dosen als angenehm anregend und antriebssteigernd empfundene Effekt tritt jedoch nur bei vorher bestehender mehr oder weniger starker Erschöpfung des Organismus ein. Die Coffeinwirkung auf einen ausgeruhten Körper ist sehr ungenau und wird nur in den seltensten Fällen in dieser Form angegeben. Bei exzessiv hohen Dosen besteht bei daraus resultierender Hyperergotropie die Gefahr des Umkippens in die Phase der negativen Reaktionen: Auslösung von Psychosen - diese können mit und ohne Bewußtseinsveränderungen einhergehen -, generalisierten epileptischen Anfällen und - durch Fehlsteuerung des Atemzentrums - Tod durch Apnoe.

Die leistungssteigernde Wirkung trifft auch für die Bereiche geistiger Aktivitäten zu. Der Verlauf ist parallel o.g.: die zunächst angenehme geistige Anregung, bestehend in einer Bahnung für Gedanken und Beschleunigung von Assoziationen, geht bei höheren Dosierungen in mangelnde Fixierung der Gedanken, Gedankenflucht über.

Die Höhe der Dosis der Sustanz und die Ausgangslage des Organismus bestimmen somit jeweils die regulatorische Dynamik und damit die Antwort des Organismus.

c. Direkte Organwirkung

Die direkte Wirkung am Herzen geht in Richtung Inotropie und Chronotropie. Während die Wirkungsweise als gesichert gilt, gehen in bezug auf den Angriffspunkt des Stoffes am Herzen, der die o.g. Wirkung zur Folge haben soll, die Ansichten der einzelnen Autoren auseinander. Einmal gefundene Ergebnisse erwiesen sich als nicht reproduzierbar und wenn doch, dann nur in mehr oder weniger modifizierter Form. Die bearbeiteten Texte lassen sich jedoch auf drei Hauptpunkte, die den Mechanismus einer Herzwirkung zu erklären versuchen, bringen:

- Indirekte sympathikomimetische Freisetzung von Catecholaminen, wobei die überwiegende Zahl der neueren Arbeiten dieser Meinung entgegenstehen;
- Beeinflussung der intrazellulären Konzentration von Ca^{++} - Ionen; hier ist der Angriffspunkt von Coffein auf den die Ca^{++} - Ionen freisetzenden Mechanismus noch nicht geklärt;
- Erhöhung des zellulären Gehaltes an cyclischem 3', 5'- AMP durch Hemmung der Phosphodiesterase - Aktivität, wobei dieses die am besten belegte Möglichkeit

der Wirkungsweise ist (HEIM und AMMON, 1969).

Möglicherweise über den gleichen Mechanismus, nämlich den Anstieg von cyclischem 3', 5'- AMP, läuft die Wirkung von Coffein am Magen. Nach Aufnahme der Substanz kommt es zu einer Steigerung der Magensekretion. Cytologische Untersuchungen der Magenschleimhaut ließen noch einen zweiten Effekt zu Tage treten: im Licht - und Elektronenmikroskop fanden sich nach Gabe von 3 bis 12 mg Coffein pro kg degenerative Veränderungen der oberflächlichen Mucosazellen wie zelluläre Ödeme, Degenerationen an den Mitochondrien u.a.

Am Darm hat Coffein relaxierende Wirkung, ein Effekt, der temperaturabhängig ist und mit fallender Temperatur aufgehoben und sogar ins Gegenteil verkehrt werden kann.

Man nimmt an, daß dieser Effekt auf dem oben beschriebenen Mechanismus der cAMP - Konzentrationssteigerung beruht: entweder durch eine aus der cAMP - Erhöhung resultierende Hemmung der Ca^{++} - Freisetzung, Steigerung der Rückbindung oder Hemmung der Calciumionen - Wirkung auf die Myofibrillen - ATPase (MITZNEGG et al., 1970; McFARLAND und PFAFFMAN, 1972; TAKAGI et al., 1971; ANDERSSON, 1972; PFAFFMAN und McFARLAND, 1973).

An der Niere bewirkt Coffein eine schwache Steigerung

der Diurese durch Erhöhung der Durchflußrate im Nierenmark, Hemmung der Na - Rückresorption und Veränderung des Quotienten ruhender Glomerulie zu aktiver Glomerulie zu Gunsten letzterer.

Über andere Organwirkungen fanden sich keine gesicherten Ergebnisse.

Nachfolgend eine tabellarische Zusammenstellung der genannten Coffeinwirkungen:

Herz- und Kreislauffunktion	positiv inotrop, positiv chronotrop, kein RR - Anstieg
Magen	Magensekretion↑, degenerative Mucosaveränderungen
Darm	relaxierend
Nieren	Diurese↑ durch Na - Rückresorption↓ und Durchflußvolumen↑
Fettstoffwechsel	Triglyceridlipaseaktivität↑⇒Lipolyse↑⇒Anstieg der FFS u. Depotfettmobilisation
Kohlenhydratstoffwechsel	Aktivierung der Phosphorylase⇒Glykogenolyse mit nachfolgendem Blutglucoseanstieg, Antagonist von Insulin
vegetative Funktionen und ZNS	leistungssteigernd Ermüdbarkeit↓ geistige Aufnahmefähigkeit↑ Merk - und Denkvermögen↑ Schlafqualität↓ Schlaflatenz↓

} abh. von der
Dosis u. der
Ausgangslage
d. Körpers

Abb.15: Wirkungsweise von Coffein

Nach Resorption aus dem Magen - Darm Kanal und Transport im Blut, erfolgt der Abbau von Coffein - ohne das der

Stoff bis hierher eine auf Metabolisierung deutende Veränderung erfahren hätte - in der Leber. Abzüglich der 2 % unverändert über die Niere ausgeschiedener Substanz, läuft die chemische Aufspaltung, dem Abbau der Purinbasen folgend, über Demethylierung und Oxidierung ab. Beginnend mit der Demethylierung am N_3 - Atom des 6er Ringes, übergehend auf N_7 im 5er Ring und schließlich - das konnte jedoch nur vereinzelt nachgewiesen werden - mit der Spaltung der Methylgruppe am N_1 - Atom endend (bei anderen Säugern ist die Reihenfolge anders (CORNISH und CHRISTMAN, 1957)), läuft die Metabolisierung nicht wie bei Adenin und Guanin bis zur Harnsäure, sondern nur bis zur Stufe der Methylharnsäure.

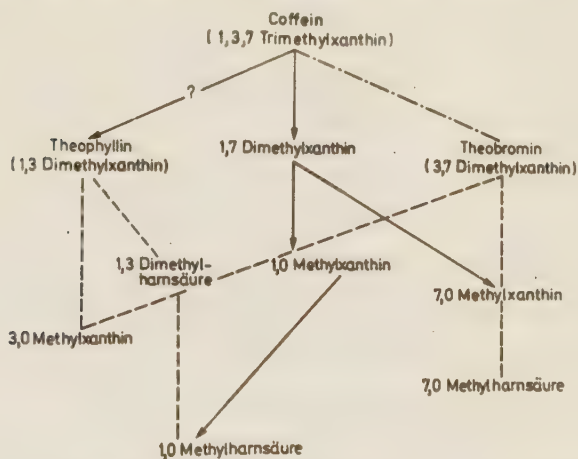


Abb. 16: Stoffwechselwege v. Coffein (—), Theophyllin u. Theobromin (---) (nach EICHLER, 1976)

Der gesamte Abbau und die Ausscheidung von Coffein erfolgt relativ schnell. Mit einer Halbwertszeit von 3,5 Stunden, das entspricht einer Eliminationsrate von 12 bis 22 % pro Stunde (AXELROD und REICHENTHAL, 1953), ist auch bei starkem Kaffeekonsum nicht mit einer Kumulation des Stoffes im Organismus zu rechnen: über Nacht wird der Körper die Gesamtmenge des während des Tages aufgenommenen Coffeins wieder eliminiert haben.

2. Chemie und Pharmakologie von Benzo(a)pyren

Die zweite Substanz, das 3,4 - Benzpyren mit der Summenformel $C_{20}H_{12}$, gehört chemisch gesehen zu der Gruppe der polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe. Es ist unlöslich in wässrigen Medien, jedoch gut löslich in allen Lipoidlösungsmitteln. Es ist ein Benzolderivat mit fünf C_6 - Ringen, dem eine ausgeprägte kanzerogene Wirkung zugeschrieben wird.



Abb.17: Strukturformel von Benzo(a)-pyren (nach BÖHLKE, 1969)

Nach der Aufnahme in den Körper wird das Benzpyren mit

dem Blutstrom - an Erythrozyten oder an Globuline gebunden (ANGHILERI, 1966 und 1967) - zum Ort des Um- und Abbaus, zur Leber, transportiert. Während der Passage durch den Organismus unterliegt der Stoff keinerlei chemischen Umwandlungen (PEACOCK, 1940), Teile werden jedoch resorbiert und in fetthaltigen Geweben und Organen eingelagert, so daß nicht die gesamte aufgenommene Dosis über die Leber metabolisiert wird.

In der Leber wird das Benzpyren nach Hydroxilierung des Ringsystems durch in der Mikrosomenfraktion der Leber lokalisierte, NADPH abhängige Enzyme, exkretionsfähig gemacht. Die dabei entstehenden Abbauprodukte - drei Dihydrodirole (9,10 - , 7,8 - und 4,5 - Dihydrodihydroxybenzpyren), drei Quinone (Benzpyren - 1,6 - dion, - 3,6 - dion und - 6,12 - dion) und zwei Phenole (9 - und 13 - Hydroxybenzpyren) - sind primäre und sekundäre Oxidationsprodukte, die als Glucuronide oder Sulfate ausgeschieden werden. Ein Teil dieser Stoffe wird über die Darmschleimhaut wieder resorbiert und durch die Niere entfernt, so daß die Exkretion des aufgenommenen Benzpyren über die Niere und die Leber geschieht.

Auffallend beim gesamten Metabolismus ist, daß trotz unterschiedlicher Applikation die ausgeschiedenen Metaboliten identisch sind, sie ändern sich nur in der Höhe der Ausscheidung. So unterliegt auch die Verarbeitung

des in der Lunge aufgenommenen Benzpyrens dem gleichen Abbaumechanismus, sobald der Stoff im Kapillarnetz der Lunge in den Blutstrom übergegangen ist. (Durch den für dieses Organ typischen Schleimfilm und das Flimmer-epithel wird jedoch nicht die gesamte eingeatmete Menge Benzpyren resorbiert, sondern zu einem guten Teil mit Hilfe der o.g. Mechanismen schon vor der Übernahme ins Blut wieder eliminiert (BÖHLKE, 1969).)

II. Methode

Zur Testung der beiden oben vorgestellten Substanzen wurde eine Chromosomenanalyse in den Zellen des Knochenmarks des Chinesischen Hamsters, *cricetulus griseus*, durchgeführt. Die Wahl gerade dieser Methode und dieses Versuchstieres läßt sich wie folgt begründen:

Bei Versuchen mit Stoffen, deren Ergebnis eine mögliche Auswirkung auf den Menschen aufzeigen soll, muß das Testsystem dem Menschen so ähnlich wie möglich gewählt werden. Dazu gehört zum einen, daß die Experimente am besten an lebenden Tieren durchgeführt werden, die ein vollständiges, für Säuger typisches, Enzymsystem haben, denn oftmals erfahren die Testsubstanzen durch Ab- oder Umbau Änderungen, die für das Resultat von Bedeutung sind.

Zum anderen müssen die Versuchstiere sensibel sein für möglichst geringe Mengen der zu testenden Substanz, wenn man z.B. die zur Mutationsauslösung eben nötige Minimaldosis austesten will oder wenn bei einem Stoff die Breite zwischen noch mutagener Wirkdosis und schon toxischer Letaldosis sehr schmal ist. Das Versuchstier sollte aber auch nicht zu empfindlich sein, um möglicherweise grosse Mengen einer Substanz, die in der Umwelt des Menschen täglich vorkommen und daher auf ihre schädigende Wirkung getestet werden sollen, noch zu tolerieren.

In meinem Falle, in dem die Stoffe in relativ geringen Dosen getestet wurden (die zweite Dosis Benzpyren ausgenommen), mußten die Tiere also die zweite Bedingung bezüglich der Sensibilität erfüllen, um sich als tauglich für den Versuch zu erweisen.

Soll dann die schädigende Wirkung eines Stoffes auf bestimmte Organe, Zellen oder Zellorganellen des Versuchstieres getestet werden, so muß auch deren Beschaffenheit und Reaktionsform so menschenähnlich wie möglich sein.

	MENSCH	HAMSTER
KARYOTYP	$2n=46$	$2n=22$
AUTOSOMEN	3 große metazentrische u. submetazentrische 2 große submetazentrische 7 mittelgroße submetazentrische 3 mittelgroße akrozentrische 3 relativ kurze metazentrische bis submetazentrische 2 kleine metazentrische 2 kleine akrozentrische	4 große metazentrische 3 mittelgroße akrozentrische 3 kleine metazentrische
GONOSOMEN	2	2

Abb.18: Vergleich des Chromosomensatzes von Mensch und Hamster (nach BASLER und HERBOLD, 1976)

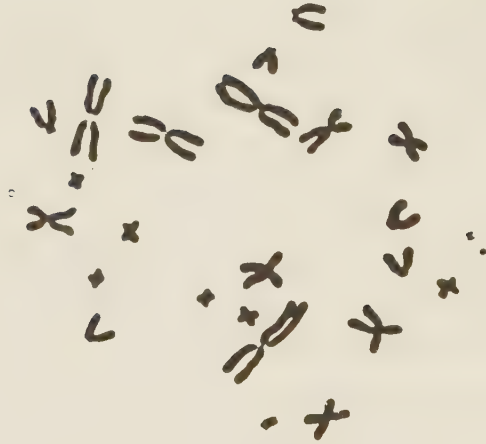


Abb.19: Chromosomensatz des Chinesischen Hamsters



Abb.20: Chromosomensatz des Chinesischen Hamsters, geordnet nach Gonosomen und Autosomen

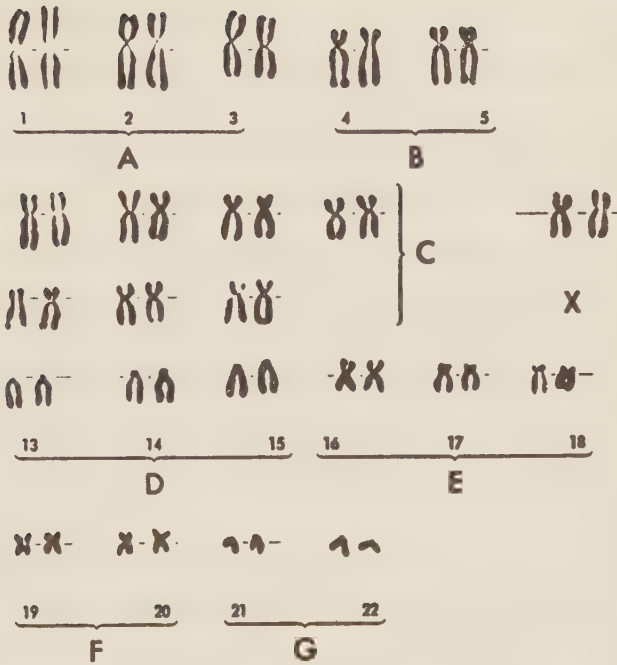


Abb. 21: Chromosomensatz des Menschen

Bei meinen Versuchen, in denen die Veränderungen an Chromosomen beurteilt werden sollten, würde man also einen dem Menschen möglichst eng verwandten Chromosomensatz fordern mit einer für die Auswertung günstigen, niedrigen Chromosomenzahl, Bedingungen, die - wie aus der vorangehenden Tabelle ersichtlich - beide vom Chinesischen Hamster erfüllt werden.

Schließlich muß die am Tier angewandte Methode - ich habe nach der Technik von MILTENBURGER gearbeitet - arbeitstechnisch nicht zu aufwendig sein - Wahrung der Relation Arbeitsaufwand : Versuchsergebnis -, mit einer geringen Fehlerquote behaftet sein, relativ unabhängig sein von äußeren Einflüssen und jederzeit reproduzierbar sein.

Die Haltung der Tiere sollte in Räumen mit für alle Tiere gleichen, konstanten Bedingungen möglich sein, eine Voraussetzung, die im Institut für Humangenetik und Anthropologie der Universität Düsseldorf gegeben ist. Die zum Versuch benötigten Tiere konnten über die Zeit konstant bei ca. 24° C Raumtemperatur und ungefähr 60 % Luftfeuchtigkeit gehalten werden. Eine Zeitautomatik regelte einen konstanten, je 24 Stunden dauernden, Tag - Nachtrhythmus. Da diese Bedingungen für alle Tiere gleich und über die Zeit konstant waren, war es möglich, die durch Schwankungen der o.g. Faktoren bedingten systema-

tischen Fehler im Ergebnis von vorneherein zu eliminieren.

Die zum Test verwandten Hamster waren Männchen und Weibchen des CH₁ - Stammes. Sie wurden in üblichen Kunststoffkäfigen nach Geschlecht getrennt gehalten. Verfüttert wurde "sniff H Hamsterfutter" der Versuchstierdiäten GmbH Soest und Wasser ad libitum.

Bevor mit den Versuchen begonnen wurde, wurden - zur Erstellung einer Kontrollgruppe - 5 männliche und 5 weibliche 8 - 12 Wochen alte Hamster mit 0,1 ml/g KG Colchicin - einem Mitosehemmstoff zur Anreicherung der in der Metaphase befindlichen Zellen - i.p. behandelt. Nach zwei Stunden Einwirkzeit wurden die Tiere mit Äther getötet und präpariert.

1. Versuch

Zuerst wurde die Gesamtzahl der für den dreiteiligen Versuch benötigten Hamster gewogen und zu Gruppen von je vier Tieren gleichen Geschlechts, deren Gewicht um nicht mehr als 4 g variierte, in einem Käfig zusammengefaßt. Diese Zusammenfassung ermöglichte rationelleres Arbeiten beim späteren Abwiegen der einzelnen Dosen der Substanzen.

Angesetzt wurden pro Versuchsreihe 8 männliche und 8 weibliche Tiere, von denen je 5 bzw. 3 Tiere ausgewertet werden sollten. Die größere Anzahl angesetzter Ham-

ster wurde gewählt, um - trotz eventuellen Absterbens von Versuchstieren - in jedem Falle genügend Männchen und Weibchen zur Auswertung zu haben. Diese Maßnahme erwies sich als begründet, da 2 Tiere der ersten Versuchsreihe kurz nach der Colchicin Applikation starben. (Über die Todesursache kann keine Angabe gemacht werden, da keine Sektion erfolgte).

Den 8 Männchen und 8 Weibchen der ersten Versuchsreihe - der gesamte Versuch läßt sich in 5 Reihen unterteilen - wurden dann 5 mal im 24 Stunden Intervall 200 mg/kg Coffein gegeben. Die Substanz war pro Tier in 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst und wurde mit der Schlundsonde gegeben. 16 Stunden nach der letzten Applikation wurde 0,1 ml/g KG Colchicin i.p. gespritzt, zwei Stunden später, also 18 Stunden nach der letzten Fütterung mit der Sonde, wurden die Tiere mit einer Überdosis Äther getötet und aufgearbeitet.

Der zweiten Gruppe, bestehend aus der gleichen Anzahl männlicher und weiblicher Tiere wie Gruppe 1, wurden 5 mal 180 mg/kg Benzpyren mit der Schlundsonde appliziert. Die Substanz war in 0,5ml H₂O und - zur besseren Löslichkeit des Stoffes - zusätzlich in 0,1 g Gummi arabicum pro Tier gelöst. Applikationsform und Zeitintervall waren gleich denen der Gruppe 1, ebenso die Bedingungen für Colchicin in bezug auf die Konzentration und den zeit-

lichen Abstand zur letzten Sondierung.

Die dritte Gruppe der Versuchstiere, gleichfalls aus 8 Männchen und 8 Weibchen bestehend, war die entscheidend wichtige Gruppe des Experimentes. An ihr sollte mit einer 5 maligen gleichzeitigen Gabe von 180 mg/kg Benzpyren und 200 mg/kg Coffein - in der oben genannten Weise gelöst - der mögliche Synergismus der beiden Stoffe getestet werden. Die Applikationsform, die Fütterungs- und Aufarbeitungsintervalle verhielten sich wie bei den vorher genannten Gruppen.

Nach den ersten Auswertungen wurde dem Versuch, der eigentlich mit den bisherigen drei Teilen abgeschlossen sein sollte, eine vierte und fünfte Versuchsserie angeschlossen.

Entsprechend der zweiten Gruppe mit 5 mal 180 mg/kg Benzpyren wurde eine Gruppe aus 6 männlichen und 6 weiblichen Tieren mit der doppelten Dosis - 360 mg/kg - im sonst identischen Versuchsaufbau getestet.

Desgleichen wurde parallel zum dritten Versuch eine 6 Männchen und 6 Weibchen umfassende Gruppe mit 360 mg/kg Benzpyren und 200 mg/kg Coffein gleichzeitig gefüttert und zur Aufarbeitung gebracht. Auch hier waren die Anordnung des Versuches und die Länge der Zeitintervalle völlig identisch.

		V E R S U C H						
	K	C	B	C	B	B	C	B
	O	O	E	O	E	E	O	E
	N	F	N	F	N	N	F	N
	T	F	Z	F + Z	Z	Z	F + Z	
	R	E	P	E	P	P	E	P
	O	I	Y	I	Y	Y	I	Y
	L	N	R	N	R	R	N	R
	L		E		E	E		E
E		N		N	N		N	
DOSIS IN mg/kg	-	200	180	200+180	360	200+360		
ZAHL DER TIERE	je 3 Männchen und 3 Weibchen							
APPLIKATIONS- FORM		5 mal oral mit der Schlund- sonde im 24 h Intervall						
COLCHICIN		16 h nach der letzten Sondierung i.p.						
INTERVALL BIS ZUM AUFARBEI- TEN	2 Stunden							

Abb.22: Übersicht über den Versuchsaufbau

2. Präparation

Zur Präparation wurden die Tiere mit Äther getötet und auf dem Rücken liegend an den Extremitäten fixiert. Das Fell wurde längs des Oberschenkelknochens aufgeschnitten und der Femur durch Mobilisation der daran befindlichen Muskulatur freipräpariert. Auf diese Weise von den Ansatzstellen der Oberschenkelmuskulatur befreit, wurde der Knochen erst im Kniegelenk und dann auch im Hüftgelenk von den anderen, angrenzenden Knochen getrennt. Die proximalen und distalen Epiphysen wurden knapp abgeschnitten und das im Knochen befindliche Knochenmark mit 1 ml 0,9 % physiologischer Kochsalzlösung von Zimmertemperatur - von jedem Knochenende aus mit 0,5 ml - in ein vorher bereitgestelltes Reagenzglas rausgespült. Mit dem zweiten Femur wurde in gleicher Weise verfahren. Da immer mehrere Tiere gleichzeitig präpariert wurden, wurden die Reagenzgläser mit dem Knochenmark der schon aufgearbeiteten Tiere im Wasserbad bei 30° C aufbewahrt, bis auch der letzte Hamster präpariert war.

Nach sorgfältigem Aufpipettieren wurden die Röhrchen in die Zentrifuge gesetzt und 10 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde abgossen und die sedimentierten Zellen zur hypotonen Behandlung mit ungefähr 2,5 ml 1 % Natriumzitratlösung pro Röhrchen versetzt. Die Natriumzitratlösung war durch Vor-

inkubieren auf eine Temperatur von 30° C gebracht worden.

Wiederum nach mehrmaligem Aufpipettieren erfolgte die Inkubation der Röhrchen im Wasserbad bei 30° C für 25 Minuten. Hierbei war es wichtig, genau die Zeit einzuhalten, um die Zellen nicht zu stark zu hypotonisieren, da sie sonst nicht mehr auszuwerten gewesen wären.

Nach genau 25 Minuten wurden deshalb die Reagenzgläser wieder aus dem Wasserbad genommen und noch einmal - zur Trennung von Zellbestandteilen und Lösung - für 10 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde wieder abgegossen und die Zellen mit Eisessig und Äthanol im Verhältnis 1 : 2,5 fixiert. Hier mußte sehr sorgfältig der Überstand entfernt werden, um die sedimentierten Zellen möglichst vollständig frei von hypotoner Lösung zu haben, die - wäre sie im Sediment verblieben - weiter auf die Zellen gewirkt hätte und das Fixativ in seiner Wirkung beeinträchtigt hätte.

Gutes Aufpipettieren vorausgesetzt, wurden die Reagenzgläser zum zweiten Teil der thermischen Behandlung in den Kühlschrank gestellt. Nach 30 Minuten wurden sie noch einmal unter den o.g. Bedingungen zentrifugiert und wiederum der vom Sediment getrennte Überstand abgegossen.

Mit neu angesetztem Fixativ versehen, wurden die Röhrchen mit Gummistopfen verschlossen und 24 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt.

Alle verwandten Reagenzgläser waren - von Beginn der Präparation an - sorgfältig beschriftet und numeriert, um Verwechslungen zu vermeiden.

Zur Herstellung der Präparate wurde am nächsten Tag nochmals zentrifugiert und das verbliebene Sediment mit ca. 0,5 ml Fixativ versetzt, so daß eine milchig, trübe Suspension entstand.

Diese wurde mittels einer Pasteurpipette aus größtmöglicher Höhe tropfenweise auf vorbehandelte, gleichmäßig mit destilliertem Wasser überzogene, Objektträger aufgebracht. Die Tropfen wurden gleichmäßig verblasen und das Präparat 3 - 4 mal kurz durch die heiße Flamme des Bunsenbrenners gezogen.

Die verwandten Objektträger waren - wie oben angedeutet - durch Lagerung in Alkohol fettfrei gemacht worden und dann, nachdem sie 3 mal mit destilliertem Wasser gespült worden waren, zusammen mit den Reagenzgläsern über Nacht im Kühlschrank gekühlt worden.

Sowohl das Auftropfen aus großer Höhe als auch die Vorkühlung der Objektträger sollen das endgültige, bis dahin bei einigen Zellen eventuell noch nicht erfolgte,

Platzen der Membranen fördern und das bessere Spreiten der Metaphasechromosomen bewirken.

Während der Präparateherstellung ist es zweckmäßig, die schon abgeflamten Objektträger im Phasenkontrastmikroskop durchzumustern. So läßt sich die Qualität der noch herzustellenden Präparate bei zu großer Zelldichte pro Gesichtsfeld durch stärkeres Verdünnen der Lösung bzw. bei zu geringer Zellzahl durch Auftropfen von entsprechend mehr Tropfen korrigieren und die spätere Auswertung erleichtern.

Nach Lufttrocknen über Nacht konnten die Objektträger am nächsten Tag gefärbt werden.

3. Färbung

Die Färbung der Objektträger erfolgte in Giemsalösung. Die Präparate wurden 10 Minuten im Färbegrad belassen und dann 2 mal 5 Minuten in destilliertem Wasser entfärbt. Dadurch wurden die Chromosomen gleichmäßig angefärbt und die grobe Morphologie war, den Anforderungen entsprechend, gut zu erkennen.

Nachdem die Objektträger gut getrocknet waren - am besten wieder über Nacht - wurden sie in Xylol getaucht und mit Eukitt eingedeckt. Das vorherige Eintauchen in Xylol erleichtert dabei die gleichmäßige Verteilung des Eukitts zwischen Objektträger und Deckglas.

Diese Präparationsmethode nach MILTENBURGER, die als modifizierte Fassung auf der Knochenmark - Methode von SCHMID und STAIGER, (Zürich) beruht, hat den Vorteil, daß sie weniger aufwendig ist. Durch Vereinfachungen in der Anleitung zur Behandlung des herauspräparierten Knochenmarks lassen sich an einigen kritischen Stellen mögliche Fehlerquellen ausschalten.

Vor allem die hypotone Behandlung wurde durch MILTENBURGER wesentlich vereinfacht. Bei seiner Methode entfällt das fraktionierte Zugeben der hypotonen Lösung ebenso wie das mehrmalige Aufpipettieren während eines 15 minütigen Verbleibs der Reagenzgläser in einem mit Eiswürfeln gefüllten Gefäß.

Das gleiche gilt für das Fixieren: wieder kann nach MILTENBURGER das Fixativ auf einmal zum Sediment gegeben werden, das 2 mal wiederholte, tropfenweise Hinzufügen der Fixierlösung unter ständigem Aufklopfen entfällt.

Die Vereinfachung der Handgriffe hilft Ungenauigkeiten, die zu Fehlern im Resultat führen können, vermeiden, und kürzt den gesamten Präparationsverlauf ab.

Die Ergebnisse sowohl der einen als auch der anderen Methode sind gut, jedoch ist das Verfahren nach MILTENBURGER - wie oben gefordert - praktikabler, weniger

aufwendig und fehlersicherer durch Reduktion komplizierter Behandlungsteile auf einfacherere, gleichermassen effektive.

D. Ergebnisse

I. Ergebnisse der Kontrollgruppe

Die Zahl der spontanen Aberrationen wurde durch die Auswertung von 600 Metaphaseplatten weiblicher Tiere und die gleiche Anzahl Metaphasen männlicher Tiere aus dem gleichen Tierpool ermittelt.

Sie lag mit 15 entsprechend 1,2 % sehr niedrig. Rechnet man aus den o.g. Gründen die achromatischen Läsionen ab, so resultiert mit 5 beobachteten Aberrationen eine Rate von 0,4 %. Es traten 3 Brüche auf und 2 Fragmente. Andere Mutationsformen fanden sich bei der Negativkontrolle nicht.

Schlüsselt man das Ergebnis nach männlichen und weiblichen Tieren auf, so finden sich bei den Männchen 2 Brüche, 6 Gaps und 2 Fragmente. Bei den Weibchen traten 1 Bruch und 4 Gaps auf, Fragmente wurden nicht gesehen.

	♀	♂
BRUCH	1	2
GAP	4	6
FRAGMENT	-	2
RINGCHROMOSOM	-	-
DELETION BZW. DEFIZIENZ	-	-
GESAMT	5	10

Abb.23: Aberrationen der weiblichen bzw. männlichen Tiere in der Negativkontrolle

II. Coffein

Gruppe 1: 5 Männchen und 5 Weibchen erhielten 5 mal 200 mg/kg Coffein. 1200 Metaphasen wurden ausgewertet. Das Ergebnis mit 20 aberranten Chromosomensätzen inklusive Gaps und 10 exklusive Gaps zeigt eine schwache Erhöhung gegenüber der Kontrolle. Es traten 6 Brüche, 10 Gaps, 2 Fragmente und 2 Deletionen auf, Ringchromosomenbildungen konnten nicht beobachtet werden. Eine Metaphase zeigte mit einer Deletion, einem Fragment und einem Gap multiple Aberrationen.

Die Auflistung der Ergebnisse getrennt für die männlichen und weiblichen Tiere ergab - wie auch aus Abbildung 26 zu entnehmen - 2 Brüche, 5 Gaps, 1 Fragment und 1 Deletion für die Weibchen, 4 Brüche, 5 Gaps, 1 Fragment sowie 1 Deletion für die Männchen.

III. Benzo(a)pyren

Gruppe 2: Die 1200 Metaphasen der mit Benzpyren behandelten männlichen und weiblichen Hamster zeigen die Summe von 16 Aberrationen. Diese 1,3 % verringern sich um mehr als die Hälfte auf 0,5 %, zieht man die Zahl der Gaps ab.

Die Verteilung der Chromosomenveränderungen zwischen den Geschlechtern findet sich wiederum in Abbildung 26:

weibliche mit Benzpyren behandelte Hamster wiesen in ihren Chromosomensätzen 2 mal Brüche, 3 mal Gaps und 1 mal eine Fragmentbildung auf. Bei den Metaphasen der männlichen Tiere wurden 2 Brüche, 6 Gaps und 2 Deletionen beobachtet. Weder bei den Männchen noch bei den Weibchen wurden Fragment - oder Ringbildungen gesehen.

IV. Coffein und Benzo(a)pyren

Gruppe 3 ist die erste Tiergruppe im Gesamtversuch, an der der mögliche Synergismus getestet wurde. Die Auswertung der Chromosomensätze ergab für die weiblichen Hamster 2 Brüche, 2 Deletionen und 2 Gaps, für die männlichen Tiere 1 Bruch, 1 Fragment und 1 Gap.

Berechnet man aus diesen Zahlen die Aberrationsrate, so liegt diese bei 0,7 % inklusive Gaps entsprechend 0,5 % exklusive Gaps.

V. Einfluß der Dosis auf die Mutagenität von Benzo(a)-pyren

Nachdem mit der Dosis von 180 mg/kg 5 mal appliziert kein mutagener Effekt nachgewiesen werden konnte, wurden noch einmal in einer 4. Gruppe Hamster mit Benzo(a)-pyren behandelt, jedoch in doppelter Dosis - 5 mal 360 mg/kg - um die Abhängigkeit eines mutagenen Effektes von der Dosis zu testen.

Die Auswertung der angefertigten Metaphasen der auf diese Art behandelten Hamster ergab in absoluten Zahlen 14 Aberrationen entsprechend einer Prozentzahl von 1,1. Rechnet man auch hier wieder die achromatischen Läsionen ab, reduziert sich das Ergebnis auf 7 Veränderungen entsprechend 0,5 %.

Abbildung 26 gibt die Verteilung der Mutationen auf die männlichen und weiblichen Tiere mit 1 Bruch, 6 Gaps und 5 Fragmenten für die Weibchen sowie 1 Bruch und 1 Gaps für die Männchen wieder.

Als Korrelat zu Versuch 3 wurde in der 5. Gruppe die alte Coffeindosis wieder aufgegriffen und synchron mit der neuen, doppelten Menge Benzpyren aus Versuch 4 appliziert. Bei der mikroskopischen Untersuchung der nach der gleichen Methode wie oben angefertigten Chromosomensätze fanden sich 1 Bruch, 2 Gaps und 2 Deletionen in den Metaphasen der weiblichen Versuchstiere gegenüber 3 Brüchen, 7 Gaps, 1 Fragment und 3 Deletionen in den Präparaten der männlichen Tiere. Diese Ergebnisse in Prozentzahlen ausgedrückt bedeuten: unter 1200 ausgewerteten Metaphasen fanden sich 1,5 % strukturelle Veränderungen.

Alle bisher genannten Ergebnisse finden sich noch einmal auf den folgenden Seiten in Abbildungen zusammengestellt. Zum Teil wurde im Text schon auf die einzelnen Abbildungen verwiesen.

		V E R S U C H					
		K O N T R O L L E	C O F F E I N	B E N Z P Y R E N	C O F F E I N R E N	B E N Z P Y R E N	C O F F E I N R E N
DOSIS IN mg/kg		-	200	180	200+180	360	200+360
ANALYSIERTE METAPHASEN		1200	1200	1200	1200	1200	1200
ABERRATIONEN ⁿ INKL. GAPS %		15 1,25	20 1,66	16 1,33	9 0,75	14 1,16	19 1,58
ABERRATIONEN ⁿ EXKL. GAPS %		5 0,41	10 0,83	7 0,58	6 0,50	7 0,58	10 0,83
n M E T A P H A S E N MIT	B'	3	6	4	3	2	4
	G'	10	10	9	3	7	9
	F'	2	2	-	-	-	1
	R'	-	-	-	-	-	-
	D'	-	2	3	3	5	5

Abb.24: Übersicht über die Versuchsergebnisse

		♀	♂
K O N T R O L L E	INKL. GAPS	5	10
	EXKL. GAPS	1	4
C O F F E I N (200 mg)	INKL. GAPS	9	11
	EXKL. GAPS	4	6
B E N Z P Y R E N (180 mg)	INKL. GAPS	6	10
	EXKL. GAPS	3	4
C O F F E I N + B E N Z P Y R E N (200 mg + 180 mg)	INKL. GAPS	6	3
	EXKL. GAPS	4	2
B E N Z P Y R E N (360 mg)	INKL. GAPS	12	2
	EXKL. GAPS	6	1
C O F F E I N + B E N Z P Y R E N (200 mg + 360 mg)	INKL. GAPS	5	14
	EXKL. GAPS	3	7

Abb.25: Aberrationsrate für Weibchen und Männchen

		V E R S U C H						
		K	C	E	C B	B	C B	
		O	O	E	O E	E	O E	
		N	F	N	F N	N	F N	
		T	F	Z	F + Z	Z	F + Z	
		R	E	P	E P	P	E P	
		O	I	Y	I Y	Y	I Y	
		L	N	R	N R	R	N R	
		L		E	E	E	E	
		E		N	N	N	N	
DOSIS IN mg/kg		-	200	180	200+180	360	200+360	
♀	B'	1	2	2	2	1	1	
	G'	4	5	3	2	6	2	
	F'	-	1	-	-	-	-	
	R'	-	-	-	-	-	-	
	D'	-	-	1	2	5	2	
♂	B'	2	4	2	1	1	3	
	G'	6	5	6	1	1	7	
	F'	2	1	-	-	-	1	
	R'	-	-	-	-	-	-	
	D'	-	1	2	1	-	3	

Abb.26: Aberrationsrate für Weibchen und Männchen, aufgelistet nach einzelnen Mutationstypen

VI. Einfluß des Suspensionsmittels auf die Mutagenität von Benzo(a)pyren

In den vorliegenden Versuchen 3 - 5 konnte kein mutagener Effekt für Benzpyren gelöst in Gummi arabicum nachgewiesen werden. Anders bei BASLER und RÖHRBORN, die 1976 eine chromosomenschädigende Wirkung für den Stoff gelöst in Olivenöl nachweisen konnten.

Die nachfolgende Abbildung 27 wurde aus der Veröffentlichung des Experimentes in "Mutation Research" 38 entnommen. Die angegebenen absoluten Zahlen mußten um die Zahl der ebenfalls angeführten und in diesem Experiment mitberücksichtigten aneuploiden Chromosomensätze korrigiert werden, um beide Arbeiten - Versuch BASLER und RÖHRBORN, (1976) und vorliegendes Experiment - in der anschließenden Diskussion vergleichen zu können.

Wie aus der auf der folgenden Seite zitierten Abbildung ersichtlich, konnte in diesem Versuch für Benzo(a)pyren 5 mal in der Dosis von 180 mg/kg appliziert und in Olivenöl gelöst, die Aberrationsrate von absolut 24 entsprechend 6 % inklusive Gaps ermittelt werden. Bestimmt man die Summe der Mutationen ohne die Anzahl der achromatischen Läsionen, reduziert sich das Ergebnis absolut auf 2, was einer Prozentzahl von 0,5 entspricht.

BASLER und RÖHRBORN, (1976) erhöhten in einem 2. Experiment dann die Dosis weiter noch als in der vorliegenden Arbeit - hier war die maximale Menge 360 mg/kg - auf 450 mg/kg, applizierten sie ebenfalls 5 mal und erhielten durch Auswertung von 1600 Metaphasen 12,8 % aberrante Chromosomensätze. Subtrahiert man auch hier wieder die Anzahl der Gaps, resultiert die endgültige Prozentzahl von 3,1 Aberrationen für mit 450 mg/kg Benzpyren - gelöst in Olivenöl - behandelte Tiere.

		KONTROLLE	VERSUCH	
			BENZPYREN	BENZPYREN
DOSIS in mg/kg			180	450
analysierte METAPHASEN		600	400	1600
ABERRATIONEN n		8	24	205
inkl. GAPS %		1,33	6,00	12,81
ABERRATIONEN n		3	2	51
exkl. GAPS %		0,50	0,50	3,18

Abb.27: Chromosomale Aberrationen im Knochenmark des Chinesischen Hamsters (nach BASLER und RÖHRBORN, 1976)

Ein ergänzender Versuch mit einer geringen Anzahl von Versuchstieren, in dem Benzpyren in den Dosen 180 mg/kg und 360 mg/kg gelöst in Gummi arabicum einer Tiergruppe appliziert wurde, während eine zweite Benzpyren in

beiden Dosierungen in Olivenöl gelöst erhielt, zeigte für beide Lösungsmittel bei der Menge von 180 mg/kg keinen mutagenen Effekt. Wurde jedoch die doppelte Dosis, suspendiert in Olivenöl appliziert, ließ sich ein chromosomenschädigender Effekt nachweisen. Die gleiche Dosis Benzpyren in Gummi arabicum gelöst zeigte wiederum keine Wirkung (BASLER, 1977; persönliche Mitteilung).

Die Abbildungen 28 - 31 auf den folgenden Seiten zeigen vier Beispiele für die bei der Auswertung beobachteten Aberrationsfiguren.

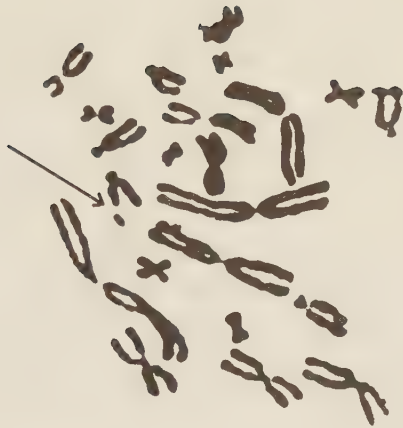


Abb.28: Chromatidenbruch



Abb.29: Chromatidengap

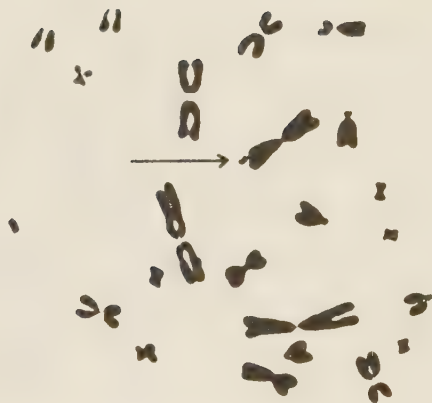


Abb. 30: Chromatidenfragment

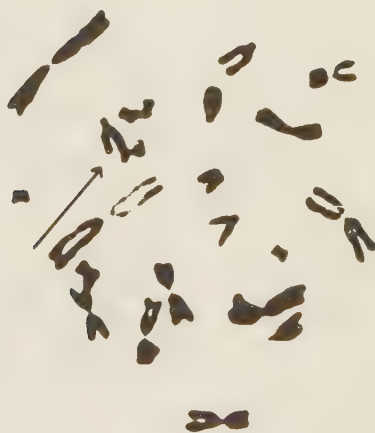


Abb. 31: Deletion

E. Diskussion

Die in diesem Versuch zur Bestimmung der spontanen Mutationsrate ausgewerteten 1200 Metaphasen zeigten inklusive Gaps 15 mal entsprechend 1,2 % bzw. exklusive Gaps 5 mal entsprechend 0,4 % strukturelle Chromosomenaberrationen.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen für das gleiche Tier erstellten Resultate aus dem Vorjahr, die RÖHRBORN und BUCKEL 1976 für ihre Versuche als Bezugswerten dienten, so liegt die spontane Mutationsrate bei RÖHRBORN und BUCKEL doppelt so hoch. Zieht man noch eine zweite Arbeit zum Vergleich heran (BASLER und RÖHRBORN, 1976), in der ebenfalls für den Chinesischen Hamster Kontrollwerte erarbeitet wurden, so finden sich hier mit 0,5 % fast identische Angaben.

	analysierte Metaphasen	inkl. Gaps	exkl. Gaps
Kontrolle	RÖHRBORN und BUCKEL, 1976 2152	3,90 %	0,90 %
Kontrolle	RÖHRBORN und BASLER, 1976 600	1,33 %	0,50 %
Kontrolle	eigene Ergebnisse, 1977 1200	1,25 %	0,41 %

Abb. 32: Vergleich der Kontrollwerte mit den Ergebnissen der Kontrollgruppen anderer Arbeiten

Auffallend bei allen drei Versuchen ist der hohe Anteil der Gaps am Ergebnis. Liegt er für die eigene Arbeit und die von BASLER und RÖHRBORN, 1976 bei ungefähr 2/3 des Gesamtergebnisses, so beträgt bei RÖHRBORN und BUCKEL, 1976 der Anteil der achromatischen Läsionen sogar 3/4 des Endresultates.

Diese hohe Rate an Gaps ist, mit einer Ausnahme, auf die ich später noch eingehen werde, eine Beobachtung, die auch in jeder Versuchsgruppe gemacht werden kann; doch beläuft sie sich in den Experimenten anteilmäßig nur noch auf die Hälfte der Gesamtaberrationsrate.

Vergleicht man nun diese Kontrollwerte mit den Werten für die 1. Versuchsgruppe - die Zusammenstellung sowohl der absoluten als auch der Prozentzahlen für alle 5 Gruppen erfolgte in den Abbildungen 24 und 25 - so findet sich durch Verdoppelung der Bruchrate und das Auftreten von Deletionen, die in der Negativkontrolle nicht beobachtet wurden, eine Erhöhung der Aberrationsrate um 0,4 % für die mit Coffein behandelten Tiere.

Die Steigerung ist jedoch nicht hoch genug, um nach Berechnung im x^2 - Test wirklich signifikant zu sein. Es ließ sich also im 1. Versuch durch Behandlung mit 200 mg/kg Coffein keine signifikante Aberrationsrate ermitteln.

Gleiches läßt sich für Benzpyren sagen, das in der 2. Versuchsgruppe auf seine Einzelwirkung hin geprüft wurde, bevor es im 3. Versuch zusammen mit Coffein appliziert werden sollte. In der Dosis von 180 mg/kg 5 mal oral verabreicht ergab sich nach Auswertung der Metaphasen eine Aberrationsrate von 1.3 % inklusive bzw. 0.5 % exklusive Gaps; das bedeutet einen geringen Anstieg der Mutationen um 0.1 % gegenüber der Negativkontrolle. Beide Werte - abzüglich und zuzüglich der achromatischen Läsionen - liegen noch im Bereich der Kontrollwerte, so daß weder für Coffein noch für Benzpyren einzeln appliziert eine manifeste Erhöhung der Mutationsrate festgestellt werden konnte.

Wie aber ändern sich die Werte, wenn beide möglicherweise latent mutagenen Substanzen simultan appliziert werden?

Die zur Klärung dieser Frage behandelte 3. Testgruppe zeigt - wie aus Abbildung 24 ersichtlich - eine Änderungsrate von 0.7 % bzw. 0.5 %. Bezieht man auch hier wieder die Werte der Kontrolltiere in die Diskussion mit ein, so ergibt sich wie in Gruppe 2 des Versuches eine schwache Steigerung um 0.1 %.

Auffallend ist hier das starke Absinken der Zahl der Gaps von 10 in der Kontrolle auf 3 im Versuch.

Berechnungen nach dem χ^2 - Test ergaben analog der nicht mutagenen Einzelwirkung der Stoffe keinen signifikant synergistischen mutagenen Effekt für Benzpyren und Coffein.

Um zu testen, ob eine mögliche mutagene Wirkung von Benzpyren dosisabhängig ist, die nicht bei 180 mg/kg wohl aber bei Verdoppelung der applizierten Menge mutagen und synergistisch mit anderen Stoffen zu beobachten ist, wurden in einer 4. und 5. Testgruppe 360 mg/kg Benzpyren allein und dann mit 200 mg/kg Coffein zusammen an Versuchstieren getestet.

Im Vergleich der ermittelten Prozentzahlen liegt die Änderungsrate für Benzpyren allein appliziert um 0,1 % höher als in der Kontrollgruppe; stellt man jedoch die für die 360 mg Dosis Benzpyren errechneten Werte denen aus der 2. Gruppe für die Dosierung 180 mg gegenüber, so zeigt sich für beide Mengen eine identische Mutationsrate von 0,5 %.

Daraus folgt, daß ein möglicherweise latenter mutagener Effekt auch bei Verdoppelung der Dosis sich noch nicht ausprägt.

Auch die nochmalige Kombination des Stoffes in seiner höheren Dosierung mit Coffein zeigt mit einem Anstieg der Chromosomenänderungsrate von 0,4 % gegen-

über Versuchsgruppe 3 keine nach dem χ^2 -Test berechnete Signifikanz.

Die im ersten mit Coffein und Benzpyren durchgeführten Test beobachtete starke Abnahme der Gaprate gegenüber der Kontrolle und den anderen Versuchsgruppen konnte nicht noch einmal vermerkt werden. Mit 7 und 9 Gaps in den Gruppen 4 und 5 liegt die Summe speziell dieser Chromosomenveränderung im Rahmen der übrigen Werte, sodaß es sich bei der in Gruppe 3 gemachten Beobachtung um einen Zufallsbefund handeln wird.

Ebenso ergab die in Abbildung 26 durchgeführte Aufschlüsselung der Chromosomenveränderungen für männliche und weibliche Tiere keinen Hinweis, der auf ein für Männchen oder Weibchen typisches Verteilungsmuster hätte schließen lassen. Vielmehr müssen - wie inzwischen eine Versuchsserie ergeben hat - die teilweise in ihrer Häufigkeit variierenden Mutationen beim einen Geschlecht gegenüber dem anderen auf interindividuelle, nicht spezifisch weibliche oder männliche Unterschiede zurückgeführt werden (RÖHRBORN 1978, persönliche Mitteilung).

Im gesamten Ergebnis, sowohl der Kontrolle als auch dem Versuch, fand sich kein einziges Ringchromosom; ansonsten traten alle Aberrationsformen in einer mehr oder weniger großen Zahlenvarianz auf:

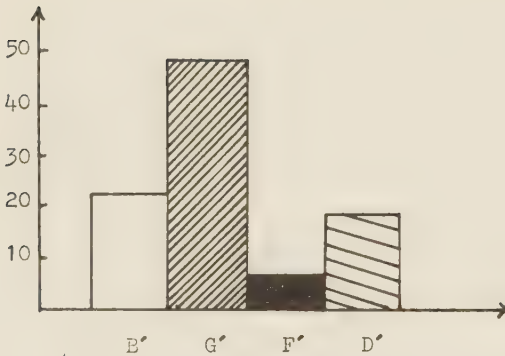


Abb. 33

Zieht man das Fazit aus allen bisher diskutierten Ergebnissen, so läßt sich folgendes sagen: Erwartungsgemäß ließ sich kein mutagener Effekt für Coffein am Knochenmark des Chinesischen Hamsters nachweisen; die Resultate für die Behandlung mit Benzo(a)pyren als auch mit Benzo(a)pyren und Coffein erbrachten weder für die Dosierung 180 mg + 200 mg noch für 360 mg + 200 mg signifikante Werte.

Demgegenüber steht die von BASLER/RÖHRBORN 1976 durchgeführte Arbeit, in der ebenfalls 180 mg/kg Benzo(a)pyren 5x appliziert wurden, aber auch 5x 450 mg/kg gegeben wurden. Für die niedrige Dosis wurde ein Mutationsergebnis von 0.5 % ermittelt, eine Prozentzahl, die - wie aus Abbildung 24 ersichtlich - gleich hoch

liegt mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werten.

Vergleicht man die aus dem vorliegenden Experiment errechneten Zahlen für die 360 mg Dosis mit denjenigen der um 90 mg höheren Dosis, so beträgt die Differenz zwischen beiden rund das 6 - fache.

Bevor jedoch mögliche Mechanismen zur Klärung dieses Befundes diskutiert werden sollen, zunächst zur Besprechung der Resultate aus dem ersten Versuch des Experimentes mit Coffein.

Der Aussage über die nicht mutagene Wirkung von Coffein ein "erwartungsgemäß" hinzuzufügen, ist, rückschauend auf die Diskussion der vergangenen Jahre über die Wirkungsweise dieser Substanz, durchaus gerechtfertigt. Obwohl zunächst auf einen positiv mutagenen Effekt von Coffein alles hinwies, erhärtete sich schon bald der Verdacht, daß sich diese Wirkung nur auf Versuche mit Bakterien und Zellkulturen beschränkte.

Die von BIESELE et al. 1952 ausgearbeitete Theorie, die eine mutagene Wirkung von Coffein auch in anderen als den o.g. Systemen wahrscheinlich gemacht hätte, war der Auslöser gewesen, Coffein als mutagen zu bezeichnen.

BIESELE war von der Ähnlichkeit der chemischen Struk-

tur zwischen Coffein und den Basen Adenin und Guanin der DNA ausgehend, zu dem Schluß gekommen, daß der Stoff als Basenanalogen in die DNA eingebaut, zu Mutationen führen könnte.

Der Einbau wäre jedoch nur dann möglich, wenn Coffein entweder vollständig, zumindest aber in der N_1 - Position demethyliert würde, da in dieser Position die Kopplung an die Ribose der DNA erfolgt. Der Metabolismus im Säuger läuft jedoch nur bis zur Methylharnsäure ab und betrifft - von wenigen Ausnahmen abgesehen, wo auch die am N_1 - Atom befindliche Methylgruppe mit einbezogen wird - nur die in N_3 - und N_7 - Position lokalisierten Methylgruppen.

Daraus kann man folgern, daß Coffein über diesen Weg im Säuger nicht wirken kann.

Zusätzlich, zur weiteren Widerlegung dieser Theorie, gab es 1956 von KOCH ein Experiment mit markiertem Coffein, in dem nachgewiesen werden konnte, daß kein Coffein in die DNA eingebaut wird, so daß diese Theorie als kontestiert gelten kann.

Wenn also nicht durch direkten Einbau in die DNA, wie sonst, wenn Coffein wirklich mutagen ist, könnte es schädigend auf Chromosomen wirken?

1966 stellte OSTERTAG eine interessante Theorie auf,

basierend auf seinen Versuchen mit Zell - und Leukozytenkulturen des Menschen. Er fand für Coffeindosen zwischen 500 und 10000 $\mu\text{g/ml}$ eine gesteigerte Bruchrate, wobei besonders bei hohen Dosen mehr Chromatiden - als Chromosomenbrüche vorlagen. Diese Ergebnisse waren unabhängig von der Behandlungsdauer, traten aber nur dann auf, wenn nach der Behandlung mit Coffein mindestens eine, stärker noch, wenn zwei DNA - Replikationen bis zur Fixierung der Zelle stattgefunden hatten.

Daraus leitete er folgendes Modell der Mutagenese für Coffein ab: TS' O et al. (1962, 1963 und 1964) folgend ging er davon aus, daß sich Coffein an DNA anlagert und zwar bevorzugt dann, wenn DNA einsträngig vorliegt. Durch diese lockere "Komplexbildung" könnte ein Fehler in der Replikation entstehen: die durch Coffein besetzten Stellen würden nicht repliziert, das Resultat wäre, wie das Schema zeigt, eine teilweise "einsträngige" DNA.

Angenommen diese Einzelstränge wären nicht stabil, so könnte nach Elimination von Coffein ein Chromatidenbruch resultieren, der nach einer zweiten Replikation zum Chromosomenbruch würde.

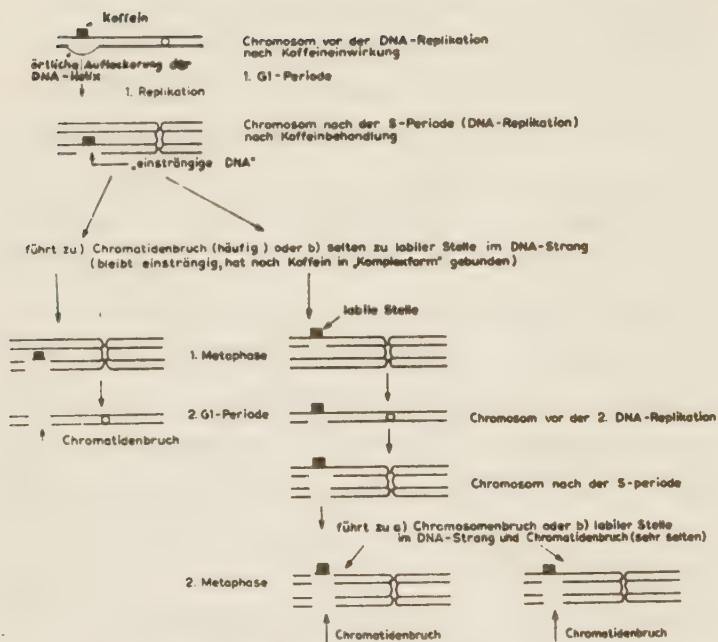


Abb.34: Theoretisches Modell der Coffeinmutagenese an Zellkulturen des Menschen (nach OSTERTAG, 1966)

Diese Befunde konnten bisher jedoch nur an Zellkulturen erhoben werden, entscheidend für die praktische Frage der Schädigung des Menschen und ihrer Tragweite bleibt laut VOGEL aber immer der Versuch am ganzen Tier. Außerdem wurden OSTERTAGs Experimente mit extrem hohen, beim Menschen kaum vorkommenden Dosen Coffein durchgeführt. Er extrapoliert zwar, ausgehend davon, daß in von

ihm getesteten Bereichen die Dosis - Effekt Kurve linear war, nach unten, jedoch ist eine solche "Berechnung" in so fern nicht korrekt, da sie einen möglichen Schwellenwerteffekt für Coffein außer Betracht läßt.

Folgt man jedoch den Befunden der letzten Jahre, so liegt ein solcher Wirkmechanismus durchaus im Rahmen des möglichen.

Bruchrate/
Chromosom

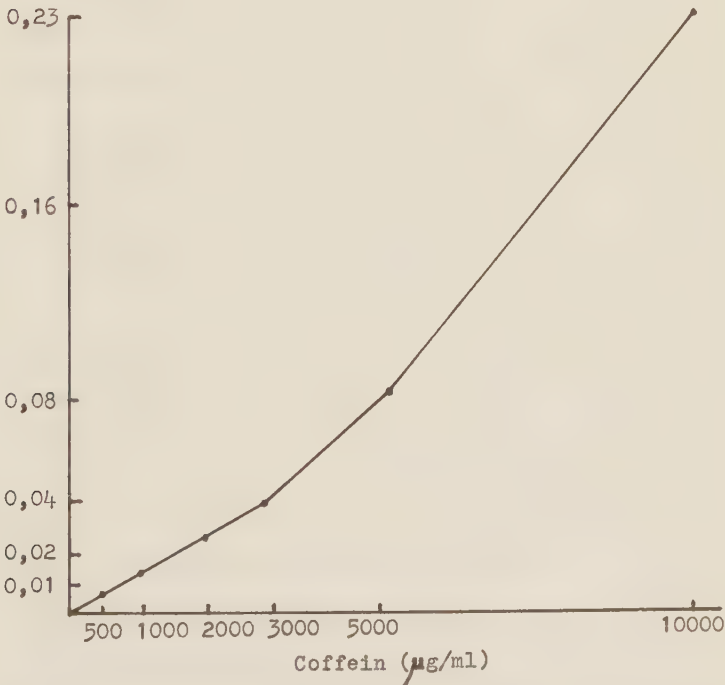


Abb.35: Bruchrate induziert durch Coffein in HeLa-Zellen, Dosisabhängigkeit (nach OSTERTAG et al., 1965)

Der Beobachtung, daß Coffein DNA nicht direkt angreift, folgte die Suche nach Angriffspunkten für die Substanz in der dem Zellzyklus folgenden Entwicklung der DNA. Die erste S - phasenspezifische Möglichkeit wurde schon oben angedeutet, aber gibt es nicht noch andere für eine Schädigung sensible Momente im Zellzyklus?

Diese Phase glaubten die Bakteriologen mit ihren an E. coli durchgeführten Versuchen gefunden zu haben. Mit Untersuchungen über die drei für Bakterien möglichen Reparaturprozesse Photoreaktivierung, Excisions - Reparatur und Reparatur durch Rekombination konnten sie eine Hemmfunktion von Coffein für diese Systeme nachweisen; man untersuchte dann auch höhere Organismen auf das Vorhandensein von Reparaturmechanismen und fand schließlich einen ähnlichen Prozeß für Plasmodien, jedoch nicht für Säugerzellen.

Damit war ein zweiter für Noxen sensibler Ansatzpunkt im Zellzyklus gefunden worden: die der S - Phase folgende Reparaturphase kann durch Coffein in ihrem regelrechten Ablauf gestört werden.

Diese Theorie, da bisher nur für Bakterien und in einem einzelnen Versuch für Plasmodien nachgewiesen, ist jedoch noch stärker mit dem Fehler mangelnder Übertragbarkeit auf Säuger in vivo behaftet: es lassen sich nur

sehr vage Schlüsse auf mögliche ähnliche Prozesse im Säuger, besonders im Menschen, ziehen.

Trotzdem sollte diese Theorie später noch einmal aufgegriffen werden und - in abgewandelter Form - zur Erklärung von beobachteten synergistischen Wirkungen von Coffein herangezogen werden.

Nun jedoch zur zweiten getesteten Substanz, Benzo(a)-pyren. Wie schon erwähnt und aus Abbildung 24 ersichtlich, ergaben die Versuche mit Benzpyren (180 mg) an männlichen und weiblichen Hamstern des CH₁ - Stammes keine Erhöhung der Aberrationsrate gegenüber der Kontrolle; auffällig ist jedoch das Auftreten von 3 Deletionen gegenüber 0 in der Kontrolle.

Vergleicht man die Ergebnisse mit den 1976 von BASLER und RÖHRBORN errechneten Zahlen, so sind die Resultate - abzüglich der Aneuploidien - übereinstimmend 0,5 %, mit dem Vorbehalt, daß in der zum Vergleich herangezogenen Arbeit nur 400 Metaphasen entsprechend 2 Tieren ausgewertet wurden gegenüber 1200 entsprechend 6 Tieren in der vorliegenden Arbeit. Die Ergebnisse könnten sich also, würde man weiter auswerten, verschieben, wahrscheinlich jedoch nur geringfügig.

Es konnte also in beiden Versuchen für mit 180 mg/kg Benzo(a)pyren behandelte Hamster kein mutagener Effekt

nachgewiesen werden.

Anders, diskutiert man die für die Dosis von 360 mg/kg Benzo(a)pyren ermittelte Mutationsrate in Zusammenhang mit den im Experiment mit 450 mg/kg errechneten Prozentzahlen aus den Versuchen von BASLER und RÖHRBORN, 1976. Zwar sind beide Ergebnisse nur bedingt zu vergleichen, da die applizierten Dosen nicht gleich waren, doch stellt sich die Frage, wie eine um 90 mg/kg größere Menge eines Stoffes eine sechsmal so hohe Aberrationsrate bewirken kann.

Es gibt mehrere Möglichkeiten der Erklärung:

Nimmt man für Benzo(a)pyren am Säuger in vivo einen Schwellenwerteffekt an, so kann man aus den bisherigen Ergebnissen folgern, daß die mutierende Wirkung auslösende Dosis zwischen 360 mg/kg und 450 mg/kg liegen muß.

Geht man jedoch von einer linearen Dosis - Wirkungskurve für Benzo(a)pyren aus, so liegen die Werte für die 5 malige Gabe von 180 mg/kg zu niedrig im Verhältnis zu den für die 5 malige Applikation von 450 mg/kg erstellten Ergebnissen.

Mögliche Begründung: die mutagene Wirkung des Stoffes konnte sich nicht entfalten, da in den vorliegenden Versuchen Benzpyren in Gummi arabicum suspendiert -

und nicht wie in den von BASLER und RÖHRBORN, 1976 durchgeführten Experimenten in Olivenöl gelöst - die Darmschleimhaut nicht permeieren konnte.

Eine ähnliche Lösungsmittelabhängigkeit von Benzpyren findet sich laut BÖHLKE, 1969 für die Wirkung des Stoffes in der Lunge. BÖHLKE entdeckte in einer Arbeit über die Abhängigkeit der Eliminationsrate von Benzpyren aus der Lunge vom Transportmittel, die unterschiedlich hohe Ausscheidungsrate von Benzpyren für verschiedene Stäube. Diese Stäube, die als Komplexbildner die Voraussetzung für die Aufnahme von Benzpyren in die Lunge von Säugern sind, bestimmen mit ihrer Teilchengröße die Verweildauer der Substanz im Lungengewebe und somit das Ausmaß der Wirkungsdauer.

Überträgt man diese Ergebnisse auf die Verhältnisse Benzpyren - Lösungsmittel im Darm, so liegt der Schluß nahe, auch im Darm eine Abhängigkeit der Permeationsfähigkeit vom Lösungsmittel zu vermuten.

Diese Annahme wurde durch die Resultate des schon im Ergebnisteil erwähnten, von BASLER 1977 durchgeführten Versuches bestätigt, der speziell zur Klärung dieser Vermutung durchgeführt wurde: bei der Untersuchung der Chromosomen mit Benzo(a)pyren behandelter Tiere - wobei eine Gruppe mit Benzpyren in Gummi arabicum, die andere mit Benzpyren gelöst in Olivenöl behandelt wur-

de - fand sich für Benzpyren suspendiert in Olivenöl eine schwach mutagene Wirkung, nicht aber für Benzpyren in Gummi arabicum. Dieses Ergebnis konnte wiederum nur für die Dosis 360 mg/kg nachgewiesen werden, nicht aber für die Applikation von 180 mg/kg.

Daraus läßt sich schließen, daß parallel der in der Junge gemachten Beobachtungen im Darm ebenfalls eine Abhängigkeit der Wirkfähigkeit von Benzpyren vom Lösungsmittel vorliegt. Benzpyren in Olivenöl gelöst und genügend hoch - nämlich mindestens 360 mg/kg - dosiert wirkt also mutagen.

Eine zweite Möglichkeit der Erklärung liegt in der Verwendung verschiedener Chargen Benzpyren, hergestellt und geliefert von verschiedenen Firmen. Die in den vorliegenden Versuchen verwandte Substanz der Firma EASTMAN besitzt einen relativ hohen Reinheitsgrad, anders die von BASLER und RÖHRBORN, 1976 verwandten Chargen der Firma FLUKA. Hier könnte über den hohen Grad an beigemischten Substanzen, die als Kokarzinogene wirken könnten, die hohe Aberrationsrate erreicht worden sein. Kokarzinogene sind Stoffe, die die unterschwellige Wirkung eines Karzinogens wirksam werden lassen und nur in Verbindung mit solchen eine Veränderung an Zellen auslösen können. Die Kokarzinogene selbst sind nicht kanzerogen.

Ähnliche Beobachtungen, die dieser Theorie zugrunde liegen, kennt man aus Versuchen von KIMMERLE, (1977). Er stellte bei der Begasung von Goldhamstern mit reinem Benzo(a)pyren fest, daß unabhängig von der Höhe der verwandten Dosen und von der Dauer der Begasung - bis zu drei Jahren - bei keinem Tier Lungentumoren festgestellt werden konnten. Wurden dem Benzpyren jedoch andere Stoffe beigemischt, so ließen sich nach kürzester Frist Bronchialcarcinome nachweisen (KIMMERLE, 1977: persönliche Mitteilung).

Übertragen auf die mutagene Wirkung von Benzpyren läßt sich daraus schließen, daß Benzpyren ebensowenig mutagen wie kanzerogen wirkt, wenn es in fast reiner Form appliziert wird. Tritt es jedoch mit anderen Substanzen zusammen auf, so wie es in der Umgebung des Menschen auch vorkommt, so wirkt sich die latent vorhandene Mutagenität aus.

Eine dritte Möglichkeit zur Klärung der widersprüchlichen Ergebnisse liefern Arbeiten von OESCH et al., (1971) und OESCH (1974).

Erinnert man noch einmal an das im Kapitel "Chemie und Pharmakologie von Benzpyren" Gesagte, daß Benzpyren durch die Lebermonooxygenase zu den aktiven Epoxiden umgewandelt, mittels der Epoxidhydratase zu inaktiven Dihydrodiolen, Quinonen und Phenolen abgebaut wird,

so müßte durch einen Hemmstoff, der speziell die Epoxidhydratase blockiert, die aktive Abbaustufe von Benzpyren erhalten bleiben und somit eine mutagene Wirkung erzielt werden können.

In Experimenten mit Enzymen aus den Mikrosomenfraktionen der Leber von Meerschweinchen gelang es OESCH et al. 1971 ein Epoxid zu finden, das spezifisch die Epoxidhydratase in ihrer Wirkung blockiert. Dieses Epoxid, Cyclohexenoxid, durch Reaktion mit einer Persäure aus Cyclohexen (C_6H_{10}) entstanden, reagiert mittels der nicht kompetitiven Hemmung mit der Epoxidhydratase. Das bedeutet, Cyclohexenoxid beeinflusst das aktive Zentrum der Epoxidhydratase derart, daß das Substrat, d.h. das Epoxid aus dem Benzpyrenabbau zwar noch gebunden werden kann, der Reaktionsablauf jedoch stark verzögert wird. Die aktiven Epoxide des Benzpyren werden verlangsamt umgesetzt zu ihren inaktiven Endprodukten, der mutagene Einfluß auf die Chromosomen kann sich auswirken.

Da diese Befunde jedoch nur am Meerschweinchen erhoben worden waren, schloß OESCH 1973 vergleichende Studien über die aus Mikrosomenfraktionen gewonnene Epoxidhydratase von Meerschweinchen-, Ratten- und menschlicher Leber an. Die Ergebnisse bezüglich

wirksamer Inhibitoren waren identisch, so daß Aussagen über an Meerschweinchen und Ratten durchgeführte Experimente auch bedingt für den Menschen gültig sind; nur "bedingt", da es sich um die Ergebnisse von in vitro Versuchen handelt.

Um die Bedingtheit der Aussage weiter einzuschränken und sie gültiger für den Menschen zu machen, müßte die Hemmung der Epoxidhydratase durch Cyclohexenoxid am lebenden Säuger getestet werden.

Ein erster Schritt in diese Richtung wurde durch den Anschluß eines Experimentes an diese Arbeit schon getan: mit 8 bis 12 Wochen alten männlichen und weiblichen Hamstern des CH₁-Stammes wurde eine LD₅₀-Kurve erstellt. Je 4 Männchen und Weibchen, deren Gewicht um nicht mehr als 4 Gramm variierte, erhielten eine bestimmte Dosis Cyclohexenoxid der Firma FLUKA. Die Applikation erfolgte mit einer Mikrospritze i.p.

Die Hamster wurden über eine Woche bei konstanten Bedingungen beobachtet und die Zahl der gestorbenen Tiere mit Datum notiert. Das Ergebnis wurde halblogarithmisch aufgetragen.

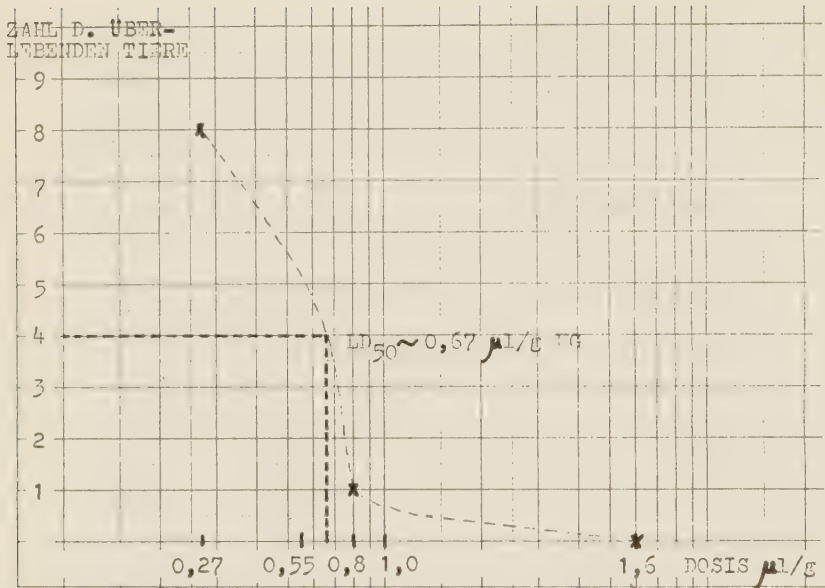


Abb. 36: LD₅₀-Bestimmung von Cyclohexenoxid

Die LD₅₀ muß also bei 0,67 $\mu\text{l/g}$ KG liegen.

Kombiniert man nun Benzpyren - wie in den Versuchen 3 und 5 geschehen - mit Coffein, so tritt ähnlich wie bei der Lösungsmittelabhängigkeit von Benzpyren durch Komplexbildung zwischen beiden Substanzen kein mutagener Effekt auf (WEIL - MALHERBE, 1946).

Abschließend läßt sich also sagen:

Übereinstimmend mit anderen Arbeiten ließ sich am Knochenmark des Chinesischen Hamsters kein mutagener Effekt von Coffein nachweisen.

Der bisher in Experimenten von BASLER und RÖHRBORN, 1976 beobachtete mutagene Effekt von Benzpyren ließ sich mit Benzpyren gelöst in Gummi arabicum nicht zeigen und konnte durch vergleichende Versuche als Lösungsmittelabhängig nachgewiesen werden.

Ein erster Schritt in der durch Arbeiten von OESCH zur Weiterforschung angezeigten Richtung wurde mit der Erstellung einer LD₅₀ - Kurve für Cyclohexenoxid getan, so daß Versuche mit Dosen unterhalb von 0,67 µl pro Gramm Körpergewicht in Zukunft unabhängig von der Aktivität der Epoxidhydratase Aussagen machen können über die Stärke der mutagenen Wirkung von Benzpyren.

Angaben über einen synergistischen Effekt von Coffein und Benzo(a)pyren konnten nicht gemacht werden. Somit bleibt der am Säuger in vivo bisher nachgewiesene Synergismus für Coffein vorläufig auf die Kombination mit Cyclophosphamid beschränkt (RÖHRBORN und BUCKEL, 1976).

F. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die synergistische Wirkung von Coffein und Benzo(a)pyren am Knochenmark des Chinesischen Hamsters untersucht.

Getestet wurden die Dosen 200 mg/kg für Coffein, 180 mg/kg und 360 mg/kg für Benzpyren. Zum Nachweis eines Synergismus wurden 200 mg/kg Coffein + 180 mg/kg Benzpyren sowie 200 mg/kg Coffein + 360 mg/kg Benzpyren simultan appliziert.

Die Applikation erfolgte 5 mal mit der Schlundsonde im 24 Stunden Intervall, 18 Stunden nach der letzten Behandlung wurden die Tiere aufgearbeitet.

Testmethode war die zytogenetische Knochenmarkanalyse.

Bei der Chromosomenanalyse zeigte sich weder eine signifikante Erhöhung der Aberrationsrate gegenüber den Kontrollwerten, wenn die Stoffe einzeln appliziert wurden, noch bei der simultanen Gabe.

Bei der Austestung der halbletalen Dosis für Cyclohexenoxid, bei der jeweils 4 Männchen und 4 Weibchen mit einer bestimmten Dosis des Stoffes i.p. behandelt wurden, ließ sich die Dosis 0,67 µl/g KG als LD₅₀ ermitteln.

G. Literaturverzeichnis

- Adler, I.D.: Cytogenetic investigations of mutagenic action of caffeine in premeiotic spermiogenesis in mice. *Humangenetik* 3, 82-83 (1966)
- Adler, I.D.; G. Röhrborn: Cytogenetic investigations of meiotic chromosomes of male mice after chronic caffeine treatment. *Humangenetik* 8, 81-85 (1969)
- Adler, I.D.: The problem of caffeine mutagenicity. In: Chemical mutagenesis in mammals and man (eds. F. Vogel, G. Röhrborn), pp.383-403. Berlin-Heidelberg-New York Springer 1970
- Andersson, R.G.G.: Cyclic AMP and calcium ions in mechanical and metabolic responses of smooth muscles; influence of some hormones and drugs. *Acta physiol. scand. Suppl.* 382, 1-59 (1972)
- Andrew, L.E.: The mutagenic activity of caffeine in *Drosophila*. *Am. Naturalist* 43, 135-138 (1959)
- Anghileri, L.J.: The effect of cations on the binding of 3,4 - benzpyrene by plasma proteins. *Naturwissen.* 53, 704 (1966)
- Anghileri, L.J.: Effect of other hydrocarbons on the "in vitro" binding of 3,4 - benzpyrene by plasma proteins. *Naturwissen.* 54, 249 (1967)

Auerbach, C.; J.M. Robson; J.G. Carr: Science (N.Y.)
105, 243 (1947)

Axelrod, J.; J. Reichenenthal: The fate of caffeine in
man and a method for its estimation in biological
material. J. Pharmacol. exp. Therap. 107, 519-523
(1953)

Basler, A.; G. Röhrborn: Chromosome aberrations in oocy-
tes of NMRI mice and bone marrow cells of Chinese
hamsters induced with 3,4 - benzpyrene. Mutat. Res.
38, 327-332 (1976)

Basler, A.; B. Herbold: Mutagenese und Umwelteinflüsse.
In: Hippokrates 47, 123-141 (1976)

Bates, T.R.; J. Galownia; W.H. Johns: Effect of complexa-
tion with caffeine on the in vitro transport of drug
molecules through an artificial membrane absorption
model. Chem. Pharm. Bull 18, 656-662 (1970)

Bauer, K.H.: Das Krebsproblem. Berlin-Göttingen-Heidel-
berg, Springer Verlag 1949

Bendigkeit, H.E.; P.C. Hanawalt: Caffeine inhibition of
DNA repair replication in E.coli. Bacteriologica Pro-
ceedings 1968, Abstracts of the 68th Annual Meeting,
p. 36

Bieseke, J.J.; R.E. Berger; M. Clarke; L. Weiss: Effect
of purines and other chemotherapeutic agents on nu-

clear structure and function. Exp. Cell Res. Suppl. 2,
279-308 (1952)

Binet, L.; L. Mallet: Gaz. Hop. (Paris) 135, 1142 (1963)

Blacklock, J.W.S.: The production of lung tumors in rats
by 3,4-benzpyrene, methylcholanthrene and the con-
densate from cigarette smoke. Brit. J. Cancer 11,
181-191 (1957)

Blumer, M.: Science 134, 474 (1961)

Böhlke, G.: Die 3,4-Benzpyren Elimination in der Ratten-
lunge vom Staub der Außenluft und anderen Träger-
stoffen. Dissertation, 1969

Borneff, J.: Arch. Hyg. 148, 1 (1964)

Borneff, J.: Hygiene, ein Leitfaden für Studenten und
Ärzte. 2. überarbeitete und erweiterte Auflage, Ge-
org Thieme Verlag, Stuttgart 1974

Brøgger, A.: Apparently spontaneous chromosome damage in
human leucocytes and the nature of chromatid gaps.
Humangenetik 13, 1-14 (1971)

Bryan, W.R.; M.B. Shimkin: Quantitative analysis of dose-
response data obtained with three carcinogenic hydro-
carbons in strain C3H male mice. J. Natl. Cancer
Inst. 3, 503 (1943)

Buselmaier, W.: Biologie für Mediziner. Springer Verlag

Berlin-Heidelberg-New York 1974

Catcheside, D.G.: Genetic effects of radiations. Adv.

Genet. 2, 271-366 (1948)

Christen, H.R.: Chemie. 8.Auflage 1971, S. 520-521, Verlag Diesterweg Salle, Ffm.

Clarke, C.H.: Caffeine-and aminoacid - effects upon try⁺ revertant yield in uv - irradiated hcr⁺ and hcr⁻ mutants of E. coli B/r. Molec. Gen. Genet. 99, 97-108 (1967)

Cornish, H.H.; A.A. Christman: A study of the metabolism of theobromine, theophylline and caffeine in man.

J. Biol. Chem. 228, 315-323 (1957)

Demerec, M.; B. Wallace; E.M. Witkin: The Gene. Carnegie Inst. Wash. Year Book 47, 169-176 (1948)

Demerec, M.; E.M. Witkin; B.W. Catlin; J. Flint; W.L.

Belser; C. Dissosway; F.L. Kennedy; N.C. Meyer;

A. Schwartz: The Gene. Carnegie Inst. Wash. Publ. 49, 144-151 (1950)

Demerec, M.; G. Bertani; J. Flint: A survey of chemicals for mutagenic action on E. coli. Am. Naturalist 85, 119-136 (1951)

DeVries, H.: Die Mutationstheorie. Leipzig 1901 und 1903

DeVries, H.: Die Mutationen in der Erblchkeitslehre. Berlin 1912

DeVries, H.: Naturw. 41, 598 (1916)

Donovan, P.J.; J.A. DiPaolo: Caffeine enhancement of chemical carcinogen - induced transformation of cultured Syrian Hamster cells. Cancer Res. 34, 2720-2727 (1974)

Eichler, C.: Kaffee und Coffein. 2. völlig neu bearbeitete Auflage. 1976 Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York

Eisenbrand, J.; G. Becker: Über die Erhöhung der Wasserlöslichkeit von 3,4 - Benzpyren durch Zusatz von Coffein. Dtsch. Lebensmitt. Rundsch. 63, 139-140 und 342-343 (1967)

Epstein, S.: The failure of caffeine to induce mutagenic effects or to synergize the effect of known mutagens in mice. In: Chemical Mutagenesis in Mammals and Man, S.404-419, (eds. F. Vogel, G. Röhrborn), Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1970

Evans, H.J.: Chromosome aberrations induced by ionizing radiation. Int. Rev. Cytol. 13, 221-321 (1962)

Falk, H.L.; P. Kotin; J. Murkul: The disappearance of carcinogens from soot in human lungs. Cancer 11, 482 (1958)

Falk, H.L.; P. Kotin; S.S. Lee; A. Nathan: Intermediary

- metabolism of benzpyren in the rat. J. Nat. Cancer Inst. 28, 699 (1962)
- Fries, N.; B. Kihlman: Fungal mutations obtained with methylxanthines. Nature (Lond.) 162, 573 (1948)
- Fries, N.: The production of mutations by caffeine. Hereditas 36, 134-149 (1950)
- Frei, J.V.; S. Venitt: Chromosome damage in the bone marrow of mice treated with the methylating agents methyl methanesulphonate and n - methyl - n - nitroso-urea in the presence or absence of caffeine, and its relationship with thymoma induction. Mut. Res. 29, 89-96 (1975)
- Gezelius, K.; N. Fries: Phage - resistant mutants induced in E.coli by caffeine. Hereditas 38, 112-114 (1952)
- Gorelova, N.D.; P.P. Dikun: On 3,4 - benzpyren detection in several species of smoked fish. (Fluorescent - spectral analysis). Vopro. Onkol. 4, 398-409 (1958)
- Gräf, W.: Über natürliches Vorkommen und Bedeutung der kanzerogenen polyzyklischen, aromatischen Kohlenwasserstoffe. Medizinische Klinik 60, 561 (1965)
- Greer, S.B.: Growth inhibitors and their antagonists as mutagens and antimutagens in E.coli. J. Gen. Microbiol. 18, 543-564 (1968)

- Handbuch der allgemeinen Pathologie, Band IX Erbgefüge,
Herausg. Altmann, Büchner u.a.; Berlin-Heidelberg-
New York, Springer Verlag 1974
- Harm, W.: The role of host - cell repair in liquid - hol-
ding recovery of uv - irradiated E. coli. Photochem.
Photobiol. 5, 747-760 (1966)
- Harm, W.: Differential effects of acriflavine and caf-
feine on various ultraviolet - irradiated E. coli
strains and T₁- phage. Mutat. Res. 4, 93-110 (1967)
- Hartley - Asp, B.; B.A. Kihlman: Caffeine, caffeine deri-
vatives and chromosomal aberrations. IV. Synergism
between mitomycin C and caffeine in Chinese Hamster
cells. Hereditas (Lund) 69, 326-328 (1971)
- Heim, F.; H.P.T. Ammon: Coffein und andere Methylxanthi-
ne. F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York 1969
- Herrold, K.M.; L.J. Dunham: Induction of carcinoma and
papilloma of the tracheobronchial mucosa of the Sy-
rian Hamster by intratracheal instillation of benzo
(a)pyrene J. Natl. Cancer Inst. 28, 467 (1962)
- Hieger, I.: Am. J. Canc. 29, 705 (1937)
- Humangenetik, kurzes Handbuch in 5 Bänden; Band I/1 S.45-
46; Herausg. P.E. Becker, Göttingen; Georg Thieme
Verlag Stuttgart 1968

in der Beeck, M.: Kaffeesucht und Koffeinismus. Therapie des Monats 7, 1961

Kaffee und Coffein. Referatedienst der medizinischen Literatur 1970, HAG AG

Karlson, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 8. neu bearb. Aufl. Georg Thieme Verlag Stuttgart 1972

Kihlman, B.; A. Levan: The cytological effect of caffeine. Hereditas 35, 109-114 (1949)

Kihlman, B.: A survey of purine derivatives as inducers of chromosome changes. Hereditas 38, 115-127 (1952)

Knorr, M.: Vortrag Zürich 2. Okt. 1956. Schweiz. Z. Hydrol. 19, 283 (1957)

Koch, A.L.: The metabolism of methylpurines by E. coli. I. Tracer studies. J. Biol. Chem. 219, 181-188 (1956)

Kössel, H.: Molekulare Grundlagen der Genetik. In: Handbuch der allgemeinen Pathologie Band IX Erbgefüge, Berlin-Heidelberg-New York Springer Verlag 1974

Kotin, P.; H.L. Falk; R. Busser: Distribution, retention and elimination of C¹⁴- 3,4 - benzpyrene after administration to mice and rats. J. Natl. Cancer Inst. 23, 541 (1959)

Kuntzman, R.; L.C. Mark; L. Brand; M. Jacobson; W. Levin;

- A.H. Conney: Metabolism of drugs and carcinogens by human liver enzymes. J. Pharm. Exp. Therapeutics 152, 151-156 (1966)
- Kuschinsky, G.; H. Lüllmann: Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie. 6. überarb. und erweiterte Aufl. 1974, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1974
- Lieb, M.: Enhancement of induced mutations in bacteria. Z. Vererbungslehre 22, 416-429 (1961)
- Linder, H.: Biologie. 16. überarb. und neugestaltete Aufl. J.B. Metzlersche Verlagsbuchhandlung - Stuttgart 1967
- Lyon, M.F.; J.S.R. Phillips; R.K. Searle: Test for mutagenicity of caffeine in mice. Z. Vererbungslehre 23, 7-13 (1962)
- Mallet, L.; M. Heros: Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris) 250, 943 (1960)
- Mallet, L.; M. Heros: Pollution des terres vegetales par les hydrocarbures polybenzenique du type benzo-3,4-pyrene. Compt. Rend. Acad. Sci. 254, 958 (1962)
- Malorny, G.: Pharmakologie des Coffeins. In: Alkohol und Coffein. Wiss. Veröffentlichungen der deutschen Gesellschaft für Ernährung, Band 17, 111-131. Dr. Dietrich Steinkopff Verlag Darmstadt 1970
- McCann et al.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, No 12, 5135-

5139, Dec. 1975

- McFarland, S.A.; M.A. Pfaffman: The effects of caffeine on E - C - coupling in gastrointestinal smooth muscle. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 198, 49-60 (1972)
- Metzger, K.: On the darkreactivation mechanism in ultraviolet irradiated bacteria. *Biochem. biophysic. Res. Commun.* 15, 101-109 (1964)
- Mittler, S.; J.E. Mittler; Owens: Loss of chromosomes and nondijunction induced by caffeine in *Dros. mel.* *Nature* 214, 424 (1967)
- Mitznegg, P.; F. Heim; B. Meythaler: Influence of endogenous and exogenous cyclic 3',5'-AMP on contractile responses induced by oxytocin and calcium in isolated rat uterus. *Life Sciences* 9, 121-128 (1970)
- Novick, A.: Mutagens and antimutagens. *Brookhaven Symp. Biol.* 8, 109-114 (1955)
- Oesch, F.; D.M. Jerina; J.W. Daly: Substrate specificity of hepatic epoxide hydrolase in microsomes and in a purified preparation: evidence for homologous enzymes. *Archives of Biochem. and Biophys.* 144, 253-261 (1971)
- Oesch, F.; N. Kaubisch; D.M. Jerina; J.W. Daly: Hepatic epoxide hydrolase. Structure - activity relationships for substrates and inhibitors. *Biochemistry* 10, 4858-

4860 (1971)

Oesch, F.: Xenobiotica 3, 305-340 (1973)

Ostertag, W.; E. Duisberg; M. Stürmann: The mutagenic activity of caffeine in man. Mutat. Res. 2, 293-296 (1965)

Ostertag, W.; Kersten: The action of proflavin and actinomycin D in causing chromatid breakage in human cells. Exp. Cell Res. 39, 296-301 (1965)

Ostertag, W.; J. Haake: The mutagenicity in *Dros. mel.* of caffeine and other compounds which produce chromosome breakage in human cells in culture. Z. Vererbungslehre 38, 299-308 (1966)

Ostertag, W.: Koffein- und Theophyllinmutagenese bei Zell- und Leukozytenkulturen des Menschen. Mutat. Res. 3, 249-267 (1966)

Ostertag, W.; H.G. Fromme: Morphologische und chromosomale Veränderungen an Leukozyten und HeLa Zellkulturen des Menschen und Chromosomenverlust bei *Dros. mel.* nach Koffein Applikation. Humangenetik 3, 1967

Ostertag, W.; B.J. Greif: Die Erzeugung von Chromatidenbrüchen durch Coffein in Leukozytenkulturen des Menschen. Humangenetik 3, 282-294 (1967)

Peacock, P.R.: Biophysical factors influencing the absorp-

- tion and distribution of benzpyrene, and their bearing on the mechanism of carcinogenesis. The American J. of Cancer 40, 251 (1940)
- Pfaffman, M.A.; S.A. McFarland: The effects of theophylline and cyclic AMP on the intestinal smooth muscle concentrations. Europ. J. Pharmac. 23, 147-152 (1973)
- Rauth, A.M.: Evidence for dark - reactivation of uv - light damage in mouse L -cells. Radiat. Res. 31, 121-138 (1967)
- Rauth, A.M.; B. Barton; C.PY. Lee: Effects of caffeine on L -cells exposed to mitomycin C. Cancer Res. 30, 2724-2729 (1970)
- Revell, S.H.: A new hypothesis for "chromatid" changes. In: Z.M. Bacq and P. Alexander (ed) "Radiobiology Symp. Liège, 1954"; Butterworths London, 243-253
- Revell, S.H.: The accurate estimation of chromatid breakage and its relevance to a new interpretation of chromatid aberration induced by ionizing radiations. Proc. roy. Soc. B. 150, 563-589 (1959)
- Revell, S.H.: Chromatid aberrations - the generalized theory. In: S. Wolff (ed) "Radiation - induced chromosome aberrations". Columbia Univ. Press, New York, 41-72 (1963)

- Rovell, S.H.: Evidence for a dose - squared term in the dose response curve of real chromatid discontinuities induced by x-rays, and some theoretical consequences thereof. *Mutat. Res.* 3, 34-53 (1966)
- Rieger, R.; H. Böhme: Strahleninduzierte Mutagenese: Gesichtspunkte des Genetikers. In: H. Stubbe (ed) "Strahleninduzierte Mutagenese". *Abh. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Med.* 38-62 (1962)
- Rieger, R.: Alternative Interpretationsversuche zur Entstehung chromosomaler Strukturumbauten: Bruch - Reunions- und Austausch - Hypothese. *Biol. Zbl.* 85, 29-46 (1966)
- Rieger, R.; A. Michaelis: Die Chromosomenmutationen. VEB Gustav Fischer Verlag Jena (1967)
- Roberts, J.J.; J.W. Sturrock: Enhancement by caffeine of N-methyl-N-nitrosurea induced mutations and chromosome aberrations in Chinese Hamster cells. *Mutat. Res.* 20, 243-255 (1973)
- Roberts, J.J.; K.N. Ward: Inhibition of post replication of alkylated DNA by caffeine in Chinese Hamster cells but not HeLa cells. *Chem. - Biol. Interactions* 7, 241-264 (1973)
- Röhrborn, G.: The dominant lethals: methode and

cytogenetic examination of early cleavage stages.

In: Chemical mutagenesis in mammals and man.

F. Vogel und G. Röhrborn, Springer Verlag Berlin,
S.148-155 (1970)

Röhrborn, G.: The activity of alkylating agents I.

Sensitivity mutable stages in spermatogenesis and
oogenesis. In: Chemical mutagenesis in mammals
and man. F. Vogel und G. Röhrborn, Springer Ver-
lag Berlin S.294-316 (1970)

Röhrborn, G.: Mutagenitätsuntersuchungen an Mäusen

nach chronischer Behandlung mit Coffein. In: Phy-
siol., pharmakol. und klin. Wirkg. d. Kaffees (ed
Czok, Lang). Z. Ernährungsw., Suppl. 14, 54-67 (1972)

Röhrborn, G.; U. Buckel: Investigations on the frequen-
cy of chromosome aberrations in bone marrow cells
of Chinese Hamsters after simultaneous application
of caffeine and cyclophosphamide. Humangenetik 33,
113-119 (1976)

Rommelaere, J.; M. Errera: The effect of caffeine on
the survive of uv - irradiated diploid and tetra-
ploid Chinese Hamster cells. Int. J. Radiat.
Biol. 22, 285-291 (1972)

Runge, F.F.: Kaffee. Neueste phytochem. Entdeckungen I,
144-159 (1820)

- Sax, K.: Analysis of x - ray induced chromosomal aberration in *Tradescantia*. *Genetics* 25, 41-68 (1940)
- Sax, K.: Types and frequencies of chromosomal aberrations induced by x - rays. *Cold spr. Harb. Symp. quant. Biol.* 2, 93-103 (1941)
- Schlipkötter, H.W.: Schadstoffe der Luft unter besonderer Berücksichtigung der Autoabgase. *Dtsch. Ärzteblatt* 70, 2527 (1973)
- Schröter, W.; K.-H. Lautenschläger; H. Bibrack; W. Städtler: *Chemie. Fakten und Gesetze*, 4. Aufl.; Buch- und Zeit - Verlagsgesellschaft m.b.H. Köln, 1972 S. 363 ff.
- Selkirk, J.K.; R.G. Croy; P.P. Roller; H.V. Gelboin: High-pressure liquid chromatographic analysis of benzo(a)pyrene metabolism and covalent binding and the mechanism of action of 7,8-benzoflavone and 1,2-epoxy-3,3,3-trichloropropane. *Cancer Res.* 34, 3474 (1974)
- Shankel, D.M.: "Mutational synergism" of ultraviolet light and caffeine i.E. coli. *J. Bact.* 84, 410-415 (1962)
- Shubik, P.; G. Pietra; G. Della Porta: Studies of skin carcinogenesis in the Syrian Golden Hamster. *Cancer Res.* 20, 100 (1960)

- Shubik, P.: Biological determination of the action of chemical carcinogens. In: Proceedings of the fourth National Cancer Conference. Philadelphia, J.B. Lippincott Co, 1961 pp. 113-118
- Stadler, L.J.: On the genetic nature of induced mutations in plants. Proc. 6th Congr. Genetics 1, 274-294 (1932)
- Takagi, K.; I. Takayanagi; A. Tomujama: Actions of dibutyryl cyclic adenosine monophosphate, papaverine and isoprenaline on intestinal smooth muscle. Jap. J. Pharmacol. 21, 227-241 (1971)
- Thornton, T.F.; W.E. Adams: Metaplasia of the bronchial epithelium in rats following application of benzo(a)pyrene. Cancer Res. 4, 55-59 (1944)
- Trosko, J.E.; E.H.Y. Chu: Effects of caffeine on the induction of mutations in Chinese Hamster cells by ultra - violet light. Mutat. Res. 12, 337-340 (1971)
- Toth, B.; P. Shubik: Carcinogenesis in AKR mice injected at birth with benzo(a)pyrene and dimethylnitrosamine. Cancer Res. 27, 43 (1967)
- Ts'o, P.O.P.; G.K. Helmkamp; C. Sander: Interactions of nucleosides and related compounds with nucleic acids as indicated by the change of helix - coil

- transition temperature. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.) 48, 686-697 (1962)
- Ts'o, P.O.P.; Lu: Physical binding of thymidine, adenine, caffeine, steroids and phenanthrene to DNA and poly A. Fed. Proc. 22, 583 (1963)
- Ts'o, P.O.P.: The interactions of nucleic acid. In: "The Nucleohistones" p. 149-161, ed J. Bonner and P. Ts'o, Holdenday. San Francisco 1964
- Ulrich, R.: Der Kaffee und das Coffein. Georg Thieme Verlag Stuttgart 1953
- Vogel, F.; G. Röhrborn: Chemical mutagenesis in mammals and man. Berlin-Heidelberg-New York, Springer 1970
- Walker, J.G.; B.D. Reid: Caffeine potentiation of the lethal action of alkylating agents on L-cells. Mutat. Res. 12, 101-104 (1971)
- Weil-Malherbe, H.: The solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons by purines. Biochem. J. 40, 351-363 (1946)
- Weinstein, D.; I. Mauer; H.M. Solomon: The effect of caffeine on chromosomes of human lymphocytes in vivo and in vitro studies. Mutat. Res. 16, 391-399 (1972)

- Weinstein, D.; I. Mauer; M.L. Katz; S. Kazmer: The effect of caffeine on chromosomes of human lymphocytes: a search for the mechanism of action. *Mutat. Res.* 20, 115-125 (1973)
- Weinstein, D.; I. Mauer; M.L. Katz; S. Kazmer: The effect of methylxanthines on chromosomes of human lymphocytes in culture. *Mutat. Res.* 31, 57-61 (1975)
- Witkin, E.M.: Post irradiation metabolism and the timing of ultraviolet - induced mutations in bacteria. *Proc. 10th Intern. Congr. of Genet*, Vol. 1, 280-299. Montreal, Canada 1958
- Witkin, E.M.; E.L. Farquharson: Enhancement and diminution of ultraviolet - light - initiated mutagenesis by post - treatment with caffeine in *E. coli*. In: "Mutation as cellular process" (eds. G.E.W. Wolstenholm, M. O'Conner), pp. 36-49, Ciba Found. Sym. 1969
- Witte, W.; H. Böhme: The action of caffeine on the survival of *Proteus mirabilis* and its virulent phage *Vir* after uv - irradiation and treatment with nitrogen mustard. *Mutat. Res.* 16, 133-139 (1972)
- Wolff, S.: The doubleness of the chromosome before DNA synthesis as revealed by combined x - ray and tritiated thymidine treatments. *Radiat. Res.* 14, 517-518 (1961)

Wolff, S.: Radiation induced chromosome aberrations.

Columbia Univ. Press, New York 1963

Yanders, A.F.; R.K. Seaton: The lack of mutagenicity
of caffeine in *Dros. mel.* *Am. Naturalist* 96, 277-
280 (1962)

Zetterberg, G.: The mutagenic effect of 8-ethoxycaf-
feine, caffeine and dimethylsulfate in the Ophio-
stoma back - mutation test. *Hereditas* 46, 279-311
(1959)

Herrn Prof. Dr. G. RÖHRBORN danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, der Versuchstiere und der technischen Einrichtungen.

Auch für die wertvollen Anregungen und Ratschläge, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen, möchte ich ihm herzlich danken.

LEBENS LAUF

Ich bin am 25. April 1953 in Bielefeld geboren. Die Volksschule besuchte ich vier Jahre, von April 1960 bis März 1964 in Frankfurt am Main. Vom April 1964 an besuchte ich neun Jahre lang die neusprachlichen Gymnasien in Frankfurt am Main und Düsseldorf. Am 2. Juni 1972 bestand ich das Abitur am Sankt Ursula - Gymnasium in Düsseldorf. Ich besitze das große Latinum.

Seit dem Wintersemester 1972/73 studiere ich Humanmedizin und befinde mich zur Zeit im 12. Semester.

